



**Einfluss einer mtDNA-Punktmutation im B6-mt^{NOD}-Tiermodell auf die
altersabhängige ROS Produktion, Mechanismen der antioxidativen
Verteidigung und die Calciumhomöostase**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

am Institut für Biowissenschaften
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

Rostock, 2016

vorgelegt von:

Jan Niemann

aus Rostock

geboren am 24.01.1984 in Hanau

Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Simone Erika Baltrusch

Universität Rostock

Medizinische Fakultät

Institut für Med. Biochemie und Molekularbiologie

Prof. Dr. rer. nat. Hubert Bahl

Universität Rostock

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät

Institut für Biowissenschaften, Mikrobiologie

Prof. Dr. med. Ingo Rustenbeck

Technische Universität Braunschweig

Fakultät für Lebenswissenschaften

Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Datum der Einreichung: 06.06.2016

Datum der Verteidigung: 09.12.2016

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Verwendete-Mausstämme	1
1.1.1 C57BL/6NTac Mausstamm.....	1
1.1.2 C57BL/6NTac-mt ^{NODL^LJ} -Mausstamm.....	1
1.1.3 Vergleich des physiologischen Alters von Mäusen und Menschen.....	3
1.2 Mitochondrien	4
1.2.1 Mitochondriale DNA.....	5
1.2.2 Mitochondriales Netzwerk	6
1.2.3 Mitochondriale Atmungskette.....	6
1.3 Reaktive Sauerstoffspezies	12
1.4 Antioxidative Verteidigung	15
1.4.1 Antioxidative Enzyme.....	15
1.4.2 Entkoppelnde Proteine und mitochondriale Metabolismusrate	19
1.4.3 Mitochondriale Dynamik, Mitophagie und Apoptose.....	20
1.5 Einfluss von ROS und mtDNA-Mutationen auf den Alterungsprozess	22
1.6 Calcium – Universeller Botenstoff der Zelle.....	24
1.6.1 Calcium als Regulator der oxidativen Phosphorylierung.....	24
1.6.2 Einfluss von Calcium auf ROS-Generierung und Apoptose.....	25
1.6.3 Calciumtransport durch die mitochondriale Doppelmembran	26
1.7 Zielstellung	28
2 Methoden.....	30
2.1 Versuchstiere	30
2.2 Analyse des ROS-Gehalts in Leber, Gehirn und Muskel.....	30
2.3 Isolation von Hepatozyten	31
2.4 RNA-Isolation aus isolierten Hepatozyten	32
2.5 DNA-Isolierung aus Lebergewebe	32
2.6 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	33
2.7 cDNA-Synthese	33

2.8	Real-Time PCR.....	34
2.9	Bestimmung der mtDNA-Kopienanzahl	36
2.10	ATP- und ADP-Messung in Hepatozyten	36
2.11	Bestimmung des Proteingehalts von Hepatozyten	37
2.12	Bestimmung der Cytochrom-c-Oxidase Aktivität in Hepatozyten.....	38
2.13	Cytosolische und mitochondriale Calciumhomöostase in Hepatozyten.....	39
2.14	Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials in Hepatozyten.....	42
2.15	Analyse der mitochondrialen Struktur in Hepatozyten	43
2.16	Quantifizierung mitochondrialer Loopstrukturen in Hepatozyten	43
2.17	Analyse der Dynamik von Mitochondrien unterschiedlicher Struktur.....	44
2.18	Analyse der mitochondrialen Netzwerkstruktur in Lebergewebe	44
2.19	Statistische Auswertung	45
3	Ergebnisse	46
3.1	Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies in Leber, Gehirn und Muskel.....	46
3.1.1	Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies in der Leber	46
3.1.2	Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies im Gehirn.....	47
3.1.3	Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies im Muskel.....	48
3.1.4	Vergleich der ROS-Produktion der einzelnen Gewebe.....	49
3.2	Genexpression verschiedener COX-Untereinheiten in Hepatozyten	49
3.2.1	Genexpression der Untereinheit 3	50
3.2.2	Genexpression der Untereinheit 1	50
3.2.3	Genexpression der Untereinheit 5a	51
3.2.4	Genexpression der Untereinheit 6a1	52
3.2.5	Genexpression der Untereinheit 6b1	53
3.2.6	Vergleich der Genexpressionsmuster einzelner COX-Untereinheiten.....	54
3.3	Mitochondrialer Transkriptionsfaktor A und mtDNA-Kopienanzahl	54
3.4	Genexpression antioxidativer Enzyme	56
3.5	Messungen zum Energiestoffwechsel	57
3.5.1	Messung des ATP- und ADP-Gehalts in Hepatozyten	57
3.5.2	Mitochondriales Membranpotential in Hepatozyten.....	59
3.5.3	Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase in Hepatozyten.....	59
3.5.4	Genexpression der Pyruvatcarboxylase und UCP2.....	61
3.6	Mitochondriale Dynamik.....	62

3.6.1	Genexpression mitochondrialer Fusionsproteine	62
3.6.2	Genexpression mitochondrialer Teilungsproteine	63
3.6.3	Verhältnis von mitochondrialen Teilungs- und Fusionsproteinen	65
3.6.4	Morphologische mitochondriale Analyse	66
3.7	Mitophagie und Apoptose	67
3.8	Mitochondriales Netzwerk und mitochondriale Strukturen in der Leber	69
3.8.1	Loopförmige mitochondriale Strukturen	69
3.8.2	Mitochondriales Netzwerk	71
3.9	Parallele Messung cytosolischer und mitochondrialer Ca^{2+} -Konzentration	72
3.9.1	Cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Glukosegabe	72
3.9.2	Mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration nach Glukosegabe	74
3.9.3	Cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach FCCP-Zusatz	75
3.9.4	Mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration nach FCCP-Zusatz	76
3.9.5	Genexpressionsrate mitochondrialer Calciumkanäle	77
4	Diskussion	79
4.1	Altersabhängige ROS-Produktion in der Leber, dem Gehirn und dem Muskel	80
4.2	Altersabhängige Störungen der mitochondrialen Struktur in der Leber	82
4.3	Genexpression der COX-Untereinheiten in Hepatozyten	83
4.4	Genexpressionsraten antioxidativer Enzyme in Hepatozyten	85
4.5	Mitochondrialer Metabolismus in Hepatozyten	86
4.6	Mitochondriale Teilungs- und Fusionsprozesse	88
4.7	Mitophagie und Apoptose	90
4.8	Bewertung des physiologischen Alters von Hepatozyten	92
4.9	Cytosolischer und mitochondrialer Ca^{2+} -Einstrom nach Glukose-Stimulus	93
4.10	Cytosolischen und mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration nach FCCP-Stimulus	96
5	Zusammenfassung	98
6	Anhang	101
6.1	Graphische Zusammenfassung der erhobenen Daten in der Leber	101
6.2	Vergleichende Analyse der verwendeten Fluoreszenzproteine	102
6.3	Mitochondriale Netzwerkstruktur weiterer konplastischer Stämme	103
6.4	Material	104
6.4.1	Chemikalien und Fertiglösungen	104

6.4.2	TaqMan [®] Gen Expression Assays.....	105
6.4.3	Kits	106
6.4.4	Gebrauchsmaterialien.....	106
6.4.5	Geräte	106
6.4.6	Software	107
6.4.7	Angesetzte Lösungen	107
7	Literatur	109
	Danksagung.....	121
	Selbstständigkeitserklärung.....	123

Abkürzungsverzeichnis

4-HNE	4-Hydroxynonenal
ADP	Adenosindiphosphat
AGC	Aspartat-Glutamat-Carrier
α -KG	α -Ketoglutarat
α -KGDH	α -Ketoglutarat-Dehydrogenase
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	"Analysis of variance"
ANT	Adenin-Nukleotid-Translokator
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	"Area under the curve"
BCA	Bicinchoninsäure
BNZ	binukleäres Zentrum
BSA	bovines Serumalbumin
CCD	"Charge-coupled device"
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CoA	Coenzym A
COX	Cytochrom-c-Oxidase
COX1, 2, 3, 5a, 6a1, 6b1	Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 1, 2, 3, 5a, 6a1, 6b1
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DHU	Dihydrouracil-Schleife
DJ1	Parkinson Protein 7
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNM1L	Dynamin-1-like Protein
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELK1	ETS Transkriptionsfaktor
ERK1/2	extrazelluläre Signal-regulierte Kinase 1/2
ETFQOR	Elektronentransferierende Flavoprotein-Ubichinon-Oxidoreduktase
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAM	Carboxyfluorescein

FCCP	Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon
FCS	fetales Kälberserum
FIS1	mitochondriales Fission Protein 1
FITC	Fluorescein
FMN	Flavinmononukleotid
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GP	Glycerin-3-Phosphat
GPDH	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase
GPx	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HUVEC	Humane Endothelzellen der Vena umbilicalis
IC	Isocitrat
ICDH	Isocitrat-Dehydrogenase
LHON	Leber Optikusatrophie
M13	Myosin-leichte-Ketten-Kinase
MAM	mitochondriale Außenmembran
MCU	mitochondrialer Calcium Uniporter
MELAS	mt. Enzephalomyopathie, Laktatacidose und schlaganfallähnliche Episoden
MFF	mitochondrialer Fission Faktor
MFN1, 2	Mitofusin 1, 2
MICU1, 2	mitochondriale Calcium Aufnahme Protein 1, 2
MIM	mitochondriale Innenmembran
MMP	mitochondriales Membranpotential
mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
MTDR	Mitotracker Deep Red
MTG	Mitotracker Green
mtNOD	konplastischer C57BL/6NTac-mt ^{NODLtJ} Mausstamm
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NARP	Neuropathie, Ataxie, Retinitis pigmentosa

nDNA	nukleäre Desoxyribonukleinsäure
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
OD	optische Dichte
OGDC	α -Ketoglutarat-Dehydrogenase
OPA1	Optic Atrophy 1
PARK2	Parkin
PARL	“Presenilin associated, rhomboid-like Protein”
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCX	Pyruvatcarboxylase
PDC	Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PEP	Phosphoenolpyruvat
PINK1	Serin/Threonin-Protein Kinase
PK	Pyruvatkinase
PTP	Permeabilitäts-Transitions-Pore
RNR2	16S rRNA
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rtPCR	Real-Time-quantitative-Polymerase-Kettenreaktion
SEM	Standardfehler
SLC25a23	mitochondrialer Carrier 23
SOD1, 2	Superoxiddismutase 1, 2
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TFAM	mitochondrialer Transkriptionsfaktor 1
TMRE	Tetramethylrhodamin-Ethylester
TRAP1	mtitochondriales Hitzeschockprotein 75 kDa
TRITC	Tetramethylrhodamin
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäuren
UCP1, 2, 3	Uncoupling Protein 1, 2, 3
VDAC1	spannungsabhängiges, anionenselektives Kanalprotein 1

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Generierung eines konplastischen Mausstammes am Beispiel des C57BL/6NTac-mtNODLtJ-Stammes.....	2
Abbildung 2: Unterschiede zwischen dem Kontroll- und dem mtNOD-Stamm durch mtDNA-Mutationen	3
Abbildung 3: Vergleich des physiologischen Alters von Mäusen und Menschen	4
Abbildung 4: Vereinfachter schematischer Querschnitt eines Mitochondriums	5
Abbildung 5: Vereinfachte schematische Darstellung der mitochondrialen Atmungskette	7
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Q-Zyklus an Komplex III	9
Abbildung 7: Die Unterschiedlichen Zustandsformen des BNZ im Komplex IV während der Reduktion von Sauerstoff.....	11
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Struktur der ATP-Synthase	12
Abbildung 9: Reaktionszyklus der Glutathionperoxidase	18
Abbildung 10: Oxidation von MitoSOX durch Superoxidanionen.	30
Abbildung 11: Prinzip der Konformationsänderung im Fusionsprotein nach Ca^{2+} -Bindung.	39
Abbildung 12: Zeitliches Schema der Glukose- und FCCP-Zugabe während der cytosolischen und mitochondrialen Calciummessung	41
Abbildung 13: Reaktive Sauerstoffspezies in der Leber.....	46
Abbildung 14: Reaktive Sauerstoffspezies im Gehirn.....	47
Abbildung 15: Reaktive Sauerstoffspezies im Muskel.....	48
Abbildung 16: Altersabhängige <i>COX3</i> -Genexpressionsanalyse in Hepatozyten	50
Abbildung 17: Altersabhängige <i>COXI</i> -Genexpressionsanalyse in Hepatozyten	51
Abbildung 18: Altersabhängige <i>COX5a</i> -Genexpressionsanalyse in Hepatozyten	52
Abbildung 19: Altersabhängige <i>COX6a1</i> -Genexpressionsanalyse in Hepatozyten	53
Abbildung 20: Altersabhängige <i>COX6b1</i> -Genexpressionsanalyse in Hepatozyten	54
Abbildung 21: MtDNA-Kopienanzahl und relative <i>TFAM</i> -Genexpressionsrate in Hepatozyten.....	55
Abbildung 22: Altersabhängige Genexpressionsanalyse antioxidativer Enzyme in Hepatozyten.....	56
Abbildung 23: Messung des ATP- und ADP-Gehalts in Hepatozyten.....	58
Abbildung 24: Mitochondriales Membranpotential in Hepatozyten	59
Abbildung 25: Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase in Hepatozyten	60
Abbildung 26: Genexpressionsanalyse metabolisch bedeutender Enzyme in Hepatozyten...	61

Abbildung 27: Relative Genexpression mitochondrialer Fusionsproteine in Hepatozyten....	63
Abbildung 28: Relative Genexpression mitochondrialer Teilungsproteine in Hepatozyten ..	64
Abbildung 29: Verhältnis der Genexpressionsrate mitochondrialer Fusions- und Teilungsproteine.....	65
Abbildung 30: Morphologische Analyse des mitochondrialen Elongationsgrades in Hepatozyten.....	66
Abbildung 31: Relative Genexpressionsanalyse von Mitophagie- und Apoptosemarkern in Hepatozyten.....	68
Abbildung 32: Quantifizierung loopförmiger mitochondrialer Strukturen in Hepatozyten ...	69
Abbildung 33: Analyse der Dynamik unterschiedlicher mitochondrialer Strukturen.	70
Abbildung 34: Analyse des mitochondrialen Netzwerks in Lebergewebe.....	71
Abbildung 35: Zeitlicher Verlauf der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Glukosegabe in Hepatozyten.....	73
Abbildung 36: Zeitlicher Verlauf der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration nach Glukosegabe in Hepatozyten.....	74
Abbildung 37: Cytosolischer Ca^{2+} -Einstrom in Hepatozyten nach FCCP-Zusatz	76
Abbildung 38: Mitochondrialer Ca^{2+} -Ausstrom in Hepatozyten nach FCCP-Zusatz.....	77
Abbildung 39: Relative Genexpressionsanalyse mitochondrialer Calciumkanäle und entsprechender regulatorischer Einheiten in Hepatozyten	78
Abbildung 40: Graphische Zusammenfassung der erhobenen Daten in der Leber	101
Abbildung 41: Vergleich der glukoseabhängigen Fluoreszenzintensitäten beider Fluoreszenzproteine	102
Abbildung 42: Analyse des mitochondrialen Netzwerks in Lebergewebe verschiedener konplastischer Stämme.....	103

1 Einleitung

1.1 Verwendete-Mausstämme

In dieser Arbeit wurde der C57BL/6NTac-Inzuchtstamm als Kontrollstamm verwendet. Vergleichend wurde der konplastische C57BL/6NTac-mt^{NOD^{LtJ}}-Stamm (mtNOD) mit einer Punktmutation im Gen der mitochondrial kodierten Untereinheit 3 der Cytochrom-*c*-Oxidase bzw. Komplex IV (COX3) der mitochondrialen Atmungskette analysiert. Dabei sollte untersucht werden, welche Auswirkungen eine mitochondrial kodierte Mutation auf die ROS-Produktion und den Metabolismus haben kann.

1.1.1 C57BL/6NTac Mausstamm

Der ursprüngliche C57BL/6J-Mausstamm wurde in den 1920ern von Clarence Little im Jackson Laboratory gezüchtet. Ausgehend von diesem Stamm entstanden in anderen Forschungseinrichtungen weitere Unterstämme. So wurde 1951 im National Institute of Health in Bethesda (Maryland) der Unterstamm C57BL/6N gezüchtet [1]. Auf Grundlage dieses Stammes züchtete wiederum 1991 die Firma Taconic den C57BL/6NTac-Stamm. Dieser Stamm eignet sich für die Erzeugung von transgenen und mutierten Mäusen. Des Weiteren wird dieser Stamm oft als Tiermodell in den Forschungsbereichen der Onkologie, Immunologie und Toxikologie genutzt [2].

1.1.2 C57BL/6NTac-mt^{NOD^{LtJ}}-Mausstamm

Der mtNOD-Mausstamm ist ein konplastisches Tiermodell (Abbildung 1). Dieses besitzt ein nukleäres (nDNA) und ein mitochondriales (mtDNA) Genom von zwei verschiedenen Inzuchtstämmen. Durch Rückkreuzungen des Zellkern-Genoms des einen Stammes in das Cytoplasma des anderen Stammes können konplastische Stämme erzeugt werden. Dies ist aufgrund der ausschließlich maternalen Vererbung des mitochondrialen Genoms möglich. Rückkreuzungen über mindestens 10 Generationen sind nötig um konplastische Stämme zu generieren [3].

Das nukleäre Genom des konplastischen mtNOD-Stammes stammt vom in Punkt 1.1.1 beschriebenen Kontrollstamm. Das mitochondriale Genom stammt vom NOD/LtJ Stamm. Dabei handelt es sich um ein Tiermodell, welches aufgrund von Autoimmunprozessen einen Typ 1 Diabetes mellitus entwickeln kann und daher ein geeignetes Modell in der Diabetesforschung ist [4].

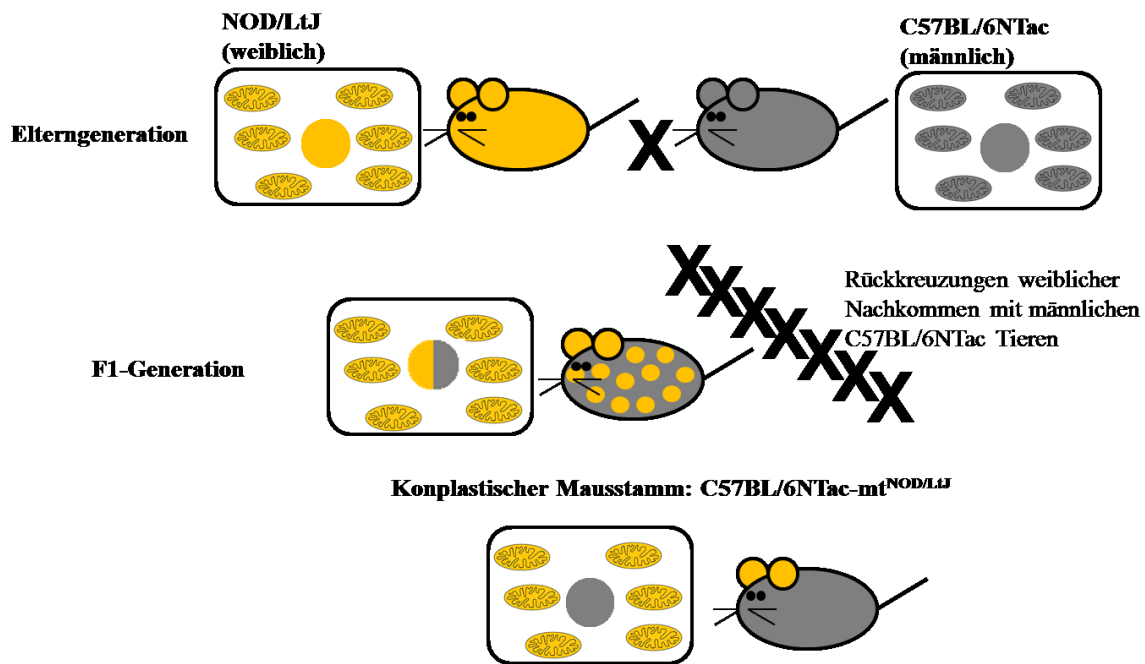


Abbildung 1: Generierung eines konplastischen Mausstammes am Beispiel des C57BL/6NTac-mt^{NOD/LtJ}-Stammes. Weibliche NOD/LtJ Tiere werden mit männlichen Tieren des C57BL/6NTac Stammes gekreuzt. Aufgrund der maternalen Vererbung der mtDNA tragen Tiere der F1-Generation das mitochondriale Genom des NOD/LtJ-Stammes und das nukleäre Genom beider parentalen Stämme. Durch Rückkreuzungen weiblicher Tiere der Folgegenerationen mit männlichen Kontrolltieren ergibt sich nach einigen Generationen der konplastische mtNOD Stamm mit mtDNA des NOD/LtJ-Stammes und nDNA des Kontrollstammes.

Im mitochondrial kodierten Gen der Untereinheit 3 des Komplex IV (COX3) der mitochondrialen Atmungskette trägt der mtNOD-Mausstamm eine Punktmutation. An Position nt9348 der mtDNA kam es zu einem Austausch von Guanin zu Adenin. In der Aminosäuresequenz von COX3 resultiert dies in einem Austausch von Valin zu Isoleucin (Abbildung 2) an Position 248 [5]. COX3 wird eine wichtige Funktion beim Transport von H⁺-Ionen aus der Matrix in den Intermembranraum zugeschrieben [6]. Außerdem ist COX3 wahrscheinlich von Bedeutung bei der Stabilisierung von Superkomplexen bestehend aus den Komplexen I, III und IV (siehe Punkt 1.2.3) [7]. Bei der Sequenzierung der mtDNA des mtNOD-Stammes konnte zusätzlich eine Insertion von Adenin an Position nt9821 festgestellt werden. Diese betrifft das Gen der tRNA-Arginin. Daher zeichnet sich die Sequenz im A-Trakt der Dihydrouracil-Schleife (DHU-Schleife) dieser tRNA im mtNOD-Stamm durch 10 und nicht wie im Kontrollstamm durch 9 aufeinanderfolgende Adenin-Nukleotide aus (Abbildung 2). Die DHU-Schleife ist für die Erkennung durch die Aminoacyl-tRNA-Synthetase verantwortlich. Diese wiederum katalysiert die Aktivierung der entsprechenden Aminosäure durch ATP und überträgt das Aminoacyl auf die tRNA [8]. Bei Mäusen wurde

eine Insertion im A-Trakt der DHU-Schleife mit altersabhängiger Schwerhörigkeit in Verbindung gebracht [9].

Treten Unterschiede in den Daten der analysierten Parameter zwischen den beiden Stämmen auf, können diese sowohl Ursache der Mutation in *COX3* als auch der Veränderung der Adenin-Folge in der DHU-Schleife der tRNA-Arginin sein. Allerdings wird angenommen, dass in erster Linie die Mutation in *COX3* für Unterschiede im Metabolismus beider Stämme verantwortlich sein sollte.

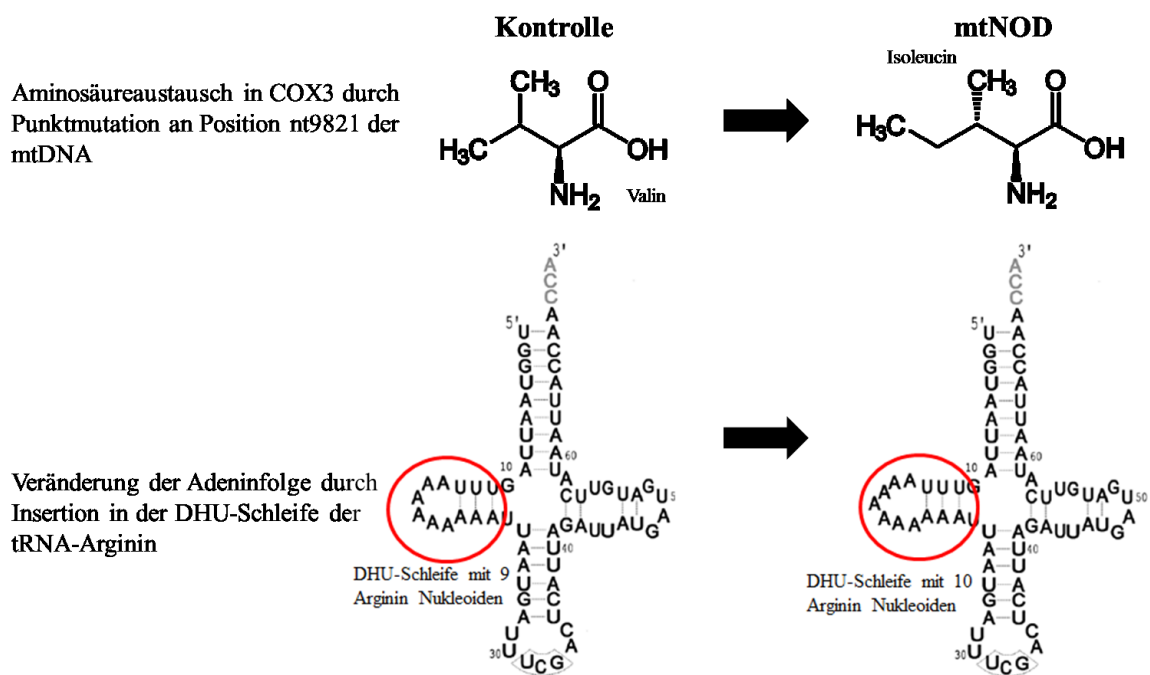


Abbildung 2: Unterschiede zwischen dem Kontroll- und dem mtNOD-Stamm durch mtDNA-Mutationen. Im mtNOD-Stamm kommt es sowohl zu einem Aminosäureaustausch von Valin zu Isoleucin in *COX3* an Position 248 als auch zu einer Veränderung in der Adenin-Folge der DHU-Schleife in der tRNA-Arginin.

1.1.3 Vergleich des physiologischen Alters von Mäusen und Menschen

Das Alter von 3 Monate alten Mäusen entspricht etwa dem Alter eines 20 Jahre alten Menschen. Der Organismus befindet sich in diesem Alter im Übergang von der juvenilen zur adulten Phase. Das Alter von 6 Monate alten Mäusen entspricht dem physiologischen Alter 30 Jahre alter Menschen, während das Alter 12 Monate alter Mäuse dem physiologischen Alter 38–47 Jahre alter Menschen entspricht. Nach 12 Monaten erreichen Mäuse daher in der Regel ungefähr die Hälfte der erwarteten Lebenszeit. 18–24 Monate alte Mäuse haben das physiologische Alter 56–69 Jahre alter Menschen (Abbildung 3) [10].

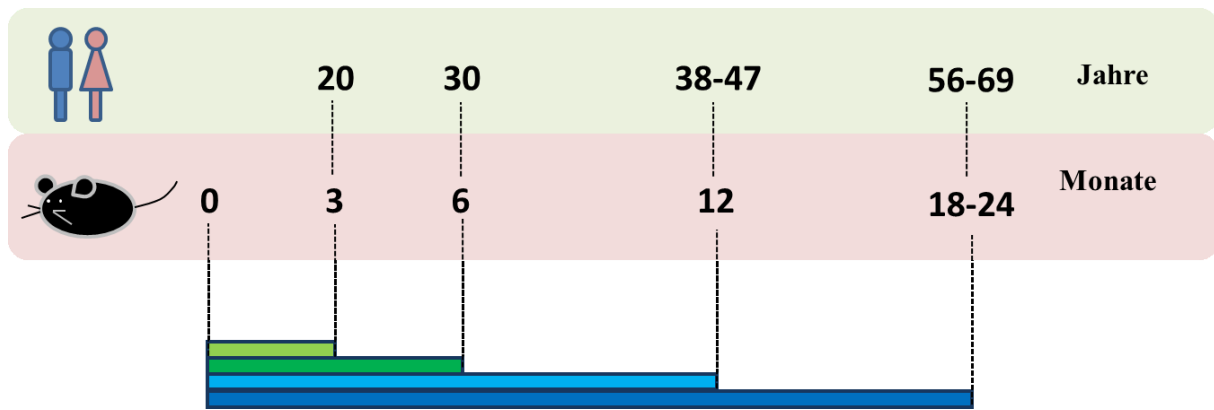


Abbildung 3: Vergleich des physiologischen Alters von Mäusen und Menschen [10].

1.2 Mitochondrien

Mitochondrien sind Organellen der Zelle, die sich aus endosymbiontischen Purpurbakterien entwickelten, welche per Phagozytose von eukaryotischen Organismen vor ca. 1,5 Milliarden Jahren aufgenommen wurden [11]. Eine bedeutende Aufgabe dieser 1–2 μm großen Organellen ist die ATP-Synthese, weswegen sie als „Kraftwerke der Zelle“ bezeichnet werden. Sie sind von einer Doppelmembran umgeben, die sie in Intermembranraum und Matrix einteilt (Abbildung 4).

Die mitochondriale Außenmembran (MAM) enthält Porine, welche den ungehinderten Austausch von Molekülen bis zu einer Größe von ca. 10 kDa ermöglichen. Die mitochondriale Innenmembran (MIM) ist auch für kleine Moleküle undurchlässig. Davon ausgenommen sind CO_2 , H_2O und O_2 . Der Molekültransport wird an der MIM über zahlreiche Transportsysteme kontrolliert. Des Weiteren ist die Oberfläche der MIM über viele Einfaltungen stark vergrößert. Diese werden Cristae oder Tubuli genannt. Das Mitochondrium besitzt eine eigene mtDNA in Form eines kleinen zirkulären Moleküls, welche sich in der Matrix befindet und in mehreren Kopien vorliegt [12].

Der Gehalt an Mitochondrien in der Zelle ist abhängig vom Gewebe. In der Regel haben Zellen aus Gewebe mit erhöhtem Energiebedarf auch eine hohe Mitochondriendichte. So befinden sich in Hepatozyten der Säugetiere zwischen 500–4000 Mitochondrien [13].

In die MIM sind die vier Komplexe der Atmungskette und die ATP-Synthase (Komplex V) integriert (Punkt 1.2.3), während in der Matrix wichtige Reaktionen des katabolen Stoffwechsels ablaufen. Dies sind z.B. die β -Oxidation von Fettsäuren und der Citratzyklus. Darüber hinaus finden in der Matrix Teilschritte der Harnstoffsynthese, der Steroidhormonsynthese und der Häm-Biosynthese statt [14].

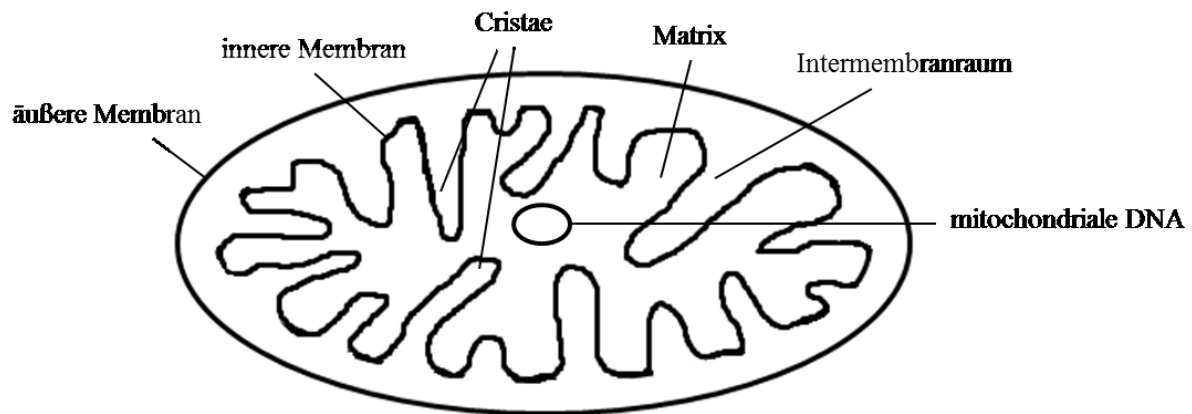


Abbildung 4: Vereinfachter schematischer Querschnitt eines Mitochondriums.

1.2.1 Mitochondriale DNA

Mitochondrien besitzen eine eigene zirkuläre DNA (mtDNA), welche maternal vererbt wird. Allerdings werden die meisten mitochondrialen Proteine von der nukleären DNA (nDNA) kodiert. Die mtDNA hat eine Größe von 16,5 Kilobasen und kodiert für 13 Polypeptide der Enzymkomplexe der mitochondrialen Atmungskette. Die restlichen Gene kodieren für 22 tRNAs und für die mitochondriale 16s- und 18s rRNA [15].

Die beiden komplementären Stränge der mtDNA werden als schwerer und leichter Strang bezeichnet. Die Bezeichnung ergibt sich daher, dass im leichten Strang überwiegend Pyrimidine und im schweren Strang überwiegend Purine vorkommen. Auf dem schweren Strang befinden sich die meisten Gene, während der leichte Strang nur für ein Polypeptid und acht tRNAs kodiert [16].

Initiator der Transkription mitochondrialer DNA ist der nukleär kodierte mitochondriale Transkriptionsfaktor 1 (TFAM) [17]. TFAM ist auch bei der Regulation der mtDNA-Kopienanzahl in der Zelle von Bedeutung [18]. Dementsprechend korreliert die mtDNA-Dichte mit der TFAM-Konzentration in der Zelle [19].

Aufgrund fehlender effizienter Reparaturmechanismen ist die Mutationsrate der mtDNA höher als die der nDNA [20]. Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass Sequenzvariationen der mtDNA einen negativen Einfluss auf die Zusammensetzung der Enzymkomplexe der mitochondrialen Atmungskette haben können und somit die Funktion der Mitochondrien negativ beeinflussen [21].

1.2.2 Mitochondriales Netzwerk

Mitochondrien bilden in der Zelle dynamische tubuläre Netzwerke, deren Form sich kontinuierlich verändert. Über proteinvermittelte Teilungs- und Fusionsprozesse können dadurch mitochondriale Konnektivität und Kopienanzahl reguliert werden [22].

Mitochondriale Teilungsprozesse werden vom GTP-bindenden Dynamin-Related Protein 1 (DNM1L; DRP1) initiiert [23]. Dieses Protein kommt überwiegend im Cytosol vor. Die Aktivierung von DNM1L wird von Proteinen vermittelt, welche an der MAM verankert sind. Diese sind u.a. das mitochondriale Fission Protein 1 (FIS1) [24] und der mitochondriale Fission Faktor (MFF) [25]. Während mitochondrialer Teilungsprozesse lagert sich DNM1L als Oligomer-Struktur an entsprechenden Schnittstellen der äußeren mitochondrialen Membran an. Die Oligomer-Struktur umschließt das Mitochondrium und durchtrennt mitochondriale Membranen unter GTP-Hydrolyse an den DNM1L-Monomeren [26].

In mitochondrialen Fusionsprozessen sind u.a. die GTP-bindenden Proteine Optic Atrophy 1 (OPA1), Mitofusin 1 (MFN1) und Mitofusin 2 (MFN2) von Bedeutung. MFN1 und 2 vermitteln dabei die Fusion der MAM, während OPA1 die Fusion der MIM vermittelt [27]. Von OPA1 existieren verschiedene Isoformen, die sich in Größe und Lokalisation unterscheiden. So besitzen größere Isoformen eine Transmembrandomäne und liegen in der MIM, während sich die kürzeren Isoformen im Intermembranraum in nächster Umgebung zur MIM befinden. Wie die unterschiedlichen Isoformen während des Fusionsprozesses miteinander interagieren ist noch nicht bekannt, aber Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen OPA1-Proteinen sind für den Fusionsprozess essentiell [28]. Aufgrund der GTP-Bindungsstelle des OPA1 ist wahrscheinlich auch hier die Hydrolyse des GTPs von Bedeutung. MFN1 und MFN2 können Proteinkomplexe untereinander bilden [29]. Die Komplexbildung ist Voraussetzung dafür, dass äußere Membranen einzelner Mitochondrien verbunden werden können [30]. Aufgrund vorhandener GTP-Bindungsstellen an MFN 1 und 2 wird angenommen, dass die Membranfusion ebenfalls über GTP-Hydrolyse eingeleitet wird [31].

1.2.3 Mitochondriale Atmungskette

Die Atmungskette dient der oxidativen Phosphorylierung und somit der ATP-Erzeugung.

Der in der Matrix ablaufende Citratzyklus synthetisiert NADH/H⁺. Diese Moleküle dienen als Elektronendonatoren und geben jeweils 2 Elektronen an Komplex I der Atmungskette ab (Abbildung 5). Dabei wird NADH/H⁺ selbst zu NAD⁺ oxidiert. Die Elektronen werden dann

auf Ubichinon übertragen, welches zuerst zu Ubisemichinon und dann zu Ubichinol reduziert wird. Anschließend werden die Elektronen über Komplex III auf Cytochrom *c* übertragen. Dieses überträgt sie wiederum auf Komplex IV. An der Matrixseite der MIM wird Sauerstoff mit den Elektronen an Komplex IV reduziert und reagiert anschließend unmittelbar mit H^+ -Ionen zu Wasser. Im Citratzyklus wird ebenfalls $FADH_2$ synthetisiert. $FADH_2$ wird an Komplex II oxidiert, wodurch Elektronen über einen Seiteneinstieg der Atmungskette auf Ubichinon übertragen werden. An Komplex II findet im Gegensatz zu den anderen Komplexen der Atmungskette kein Protonentransport in den Intermembranraum statt. Neben Komplex II sind noch weitere Seiteneinstiege der mitochondrialen Atmungskette bekannt (siehe Punkt 1.3).

MAM

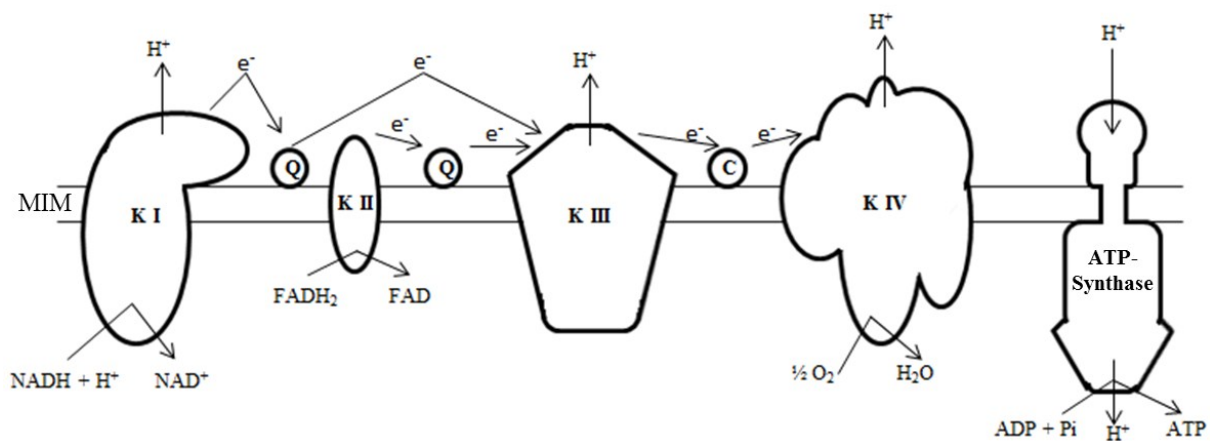


Abbildung 5: Vereinfachte schematische Darstellung der mitochondrialen Atmungskette. K I–IV: Komplex I–IV; Q: Ubichinon; C: Cytochrom *c*; MIM: Mitochondriale Innenmembran; MAM: Mitochondriale Außenmembran.

Im Verlauf der Atmungskette werden die Elektronen nacheinander auf Moleküle höherer Elektronenaffinität übertragen. Bei der Übergabe der Elektronen von Donatoren auf Elektronenakzeptoren wird Energie frei gesetzt. Diese Energie wird in den Komplexen I, III und IV genutzt um Protonen von der Matrix in den Intermembranraum zu pumpen. Der entstehende Protonengradient erzeugt an der MIM ein Membranpotential. Das mitochondriale Membranpotential (MMP) wiederum wird von der mitochondrialen ATP-Synthase genutzt um ATP aus ADP und anorganischem Phosphat zu synthetisieren [32].

Die einzelnen Atmungskettenkomplexe können in der MIM in Form von Superkomplexen vorkommen. So wurden in Mitochondrien des Rinderherzen Superkomplexe nachgewiesen, die sich aus den Komplexen I, III und IV zusammensetzen (I-III₂-IV_{0.4}) [33]. Funktionen

dieser Superkomplexe sind zum Beispiel ein effektiverer Elektronentransport über Cytochrom *c* und Ubichinon und eine Stabilisierung der Komplexe I und III [34].

1.2.3.1 Komplex I

Komplex I beziehungsweise die NADH-Dehydrogenase setzt sich im Säugetier aus 45 Untereinheiten zusammen und besitzt eine L-förmige Struktur [35]. Ein hydrophober Arm ist in der inneren mitochondrialen Membran eingebettet, während der andere hydrophile Arm in die Matrix reicht. Diese Struktur ist stark konserviert und sowohl in Mitochondrien als auch in Bakterien zu erkennen [36]. Der katalytische Kern setzt sich aus 14 Untereinheiten zusammen, welche überwiegend am Elektronentransfer beteiligt sind. Diese Untereinheiten lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Eine Gruppe setzt sich aus sieben hydrophilen, nukleär kodierten Untereinheiten zusammen, welche Bestandteile des Matrixarms sind. Die zweite Gruppe besteht aus sieben hydrophoben, mitochondrial kodierten Untereinheiten, welche Bestandteile des Membranarms sind [37]. Die Anzahl weiterer Untereinheiten, die z.B. für die Stabilität des Komplex I nötig sind, variiert in unterschiedlichen Arten. Konservierte Cofaktoren sind ein nicht kovalent gebundenes Flavinmononukleotid (FMN) und acht Eisen-Schwefel-Zentren. Diese sind in der hydrophilen Domäne gebunden [38].

Die NADH/H⁺-Bindungsstelle befindet sich an der 51 kDa Untereinheit des hydrophilen Arms in nächster Umgebung zum FMN. Die Ubichinonbindungsstelle ist noch nicht bekannt. Nachdem Elektronen von NADH/H⁺ auf FMN übertragen wurden, werden diese über sieben Eisen-Schwefel-Zentren auf Ubichinon übertragen. Das achte distal gelegene Eisen-Schwefel-Zentrum hat wahrscheinlich keine direkte Funktion im Elektronentransfer [39].

Der Mechanismus der Protonentranslokation während des Elektronentransfers in Komplex I ist noch nicht vollständig geklärt. Diskutiert werden eine protonengekoppelte Reaktion am terminalen Eisen-Schwefel-Zentrum, ein Ubichinon-Redoxzyklus und Konformationsänderungen am Komplex I während des Elektronentransfers [39].

1.2.3.2 Komplex III

Komplex III beziehungsweise die Cytochrom-*c*-Reduktase setzt sich in Mitochondrien von Säugetieren aus elf Untereinheiten zusammen. Gewöhnlich kommt er in der MIM als Dimer vor. Drei der Untereinheiten besitzen aktive Redoxzentren und sind essentiell für die Funktion des Komplex III. Dies sind die Untereinheiten Cytochrom *b* mit den Cofaktoren Häm *b_L* und Häm *b_H*, Cytochrom *c*₁ mit dem Cofaktor Häm *c* und das Rieske-Protein mit einem Eisen-

Schwefel-Zentrum (2Fe-2S) [40]. Die Cytochrom *b*-Untereinheit ist im Gegensatz zu den anderen Untereinheiten des Komplex III mitochondrial kodiert [41].

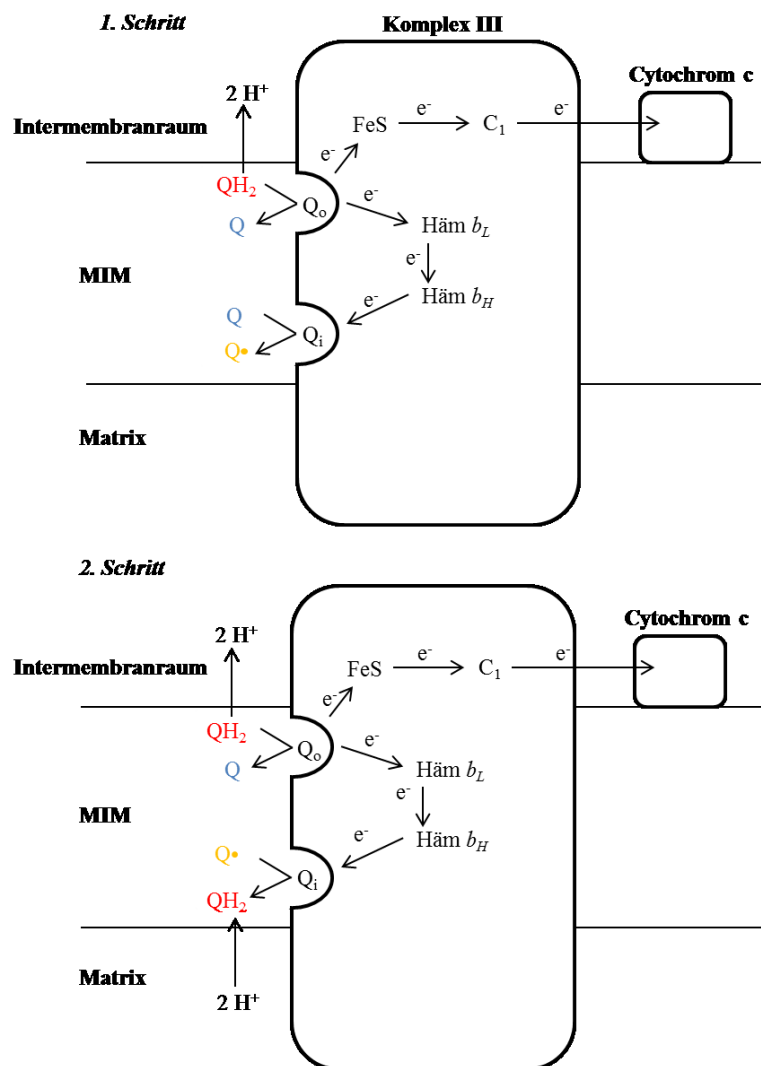


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Q-Zyklus an Komplex III. QH_2 : Ubichinol, Q : Ubichinon, Q^\bullet : Ubisemichinon, Q_o : Q_o -Bindungsstelle, Q_i : Q_i -Bindungsstelle, FeS : Eisen-Schwefel-Zentrum, C_1 : Cytochrom c_1 , MIM: mitochondriale Innenmembran.

Komplex III katalysiert die Oxidation von Ubichinol und die Reduktion von Cytochrom *c* im Verhältnis 1 zu 2. Die Oxidation des Ubichinol erfolgt an der sogenannten Q_o -Bindungsstelle (Abbildung 6). Dabei werden 2H^+ -Ionen in den Intermembranraum abgegeben. Die beiden Elektronen des Elektronendonators werden auf unterschiedliche Elektronenakzeptoren übertragen. Dies ist zum einen das Eisen-Schwefel-Zentrum des Rieske-Proteins und zum anderen Häm b_L des Cytochrom *b*. Das Elektron des Eisen-Schwefel-Zentrums kann über Häm *c* des Cytochrom c_1 auf Cytochrom *c* übertragen und dem Komplex IV zugeführt

werden. Das zweite Elektron an Häm b_L kann auf Häm b_H übertragen werden und anschließend Ubichinon an der Q_i -Bindungsstelle zu Ubisemichinon reduzieren. Wenn ein weiteres Molekül Ubichinol an Q_o oxidiert wird, wird das vorher gebildete Ubisemichinon an Q_i zu Ubichinol reduziert, welches wiederum an Q_o oxidiert werden kann. Die Q_i -Bindungsstelle kann anschließend wieder von Ubichinon besetzt werden. Bei der Reduktion von Ubichinon zu Ubichinol werden insgesamt 2 H^+ -Ionen aus der Matrix aufgenommen [42]. Dieser Kreislauf des Ubichinons an Komplex III wird Q-Zyklus genannt.

1.2.3.3 Komplex IV

Komplex IV beziehungsweise die Cytochrom-c-Oxidase setzt sich aus 14 Untereinheiten zusammen. Davon werden elf nukleär und drei mitochondrial kodiert [43]. In Mitochondrien von Säugetieren kommt Komplex IV gewöhnlich als Dimer vor [44]. Die mitochondrial kodierten Untereinheiten COX1, COX2 und COX3 bilden den katalytischen Kern des Enzyms und sind evolutionär stark konserviert. COX1 trägt die Cofaktoren Häm a , Häm a_3 und ein Kupferzentrum (Cu_B). Auch in der COX2 befindet sich ein Kupferzentrum (Cu_A). Häm a_3 und Cu_A bilden zusammen ein binukleäres Zentrum (BNZ) [45]. Im Gegensatz zu COX1 und COX2 ist COX3 nicht direkt am Elektronentransfer beteiligt. Die Funktionen von COX3 sind in Punkt 1.1.2 beschrieben. Die nukleär kodierten Untereinheiten sind weniger stark konserviert und in erster Linie für die Stabilität und Regulation des Komplex IV verantwortlich [45].

An Komplex IV wird Cytochrom c oxidiert und das Elektron auf ein Cu^{2+} -Ion im Cu_B Zentrum übertragen. Über Häm a werden Elektronen auf das BNZ weitergeleitet, wo sie letztendlich auf Sauerstoff übertragen werden. Während der Reduktion von Sauerstoff ist dieser am BNZ gebunden und nimmt nacheinander vier Elektronen von vier Cytochrom c -Proteinen auf. Bei der Reduktion gehen die beiden Atome des Sauerstoffmoleküls in aufeinanderfolgenden Reaktionen Bindungen mit vier H^+ -Ionen aus der Matrix ein. Dabei entstehen zwei Moleküle Wasser, die vom BNZ freigegeben werden. Während der Reduktion von Sauerstoff, kommt es zu einer kontinuierlichen Zustandsveränderung des BNZ (Abbildung 7) [46]. Das BNZ des Komplex IV garantiert somit eine vollständige Reduktion des Sauerstoffmoleküls zu Wasser. Eine unvollständige Reduktion des Sauerstoffs mit ein oder zwei Elektronen zu Superoxidanionen (siehe 1.3) kann so effektiv verhindert werden [47].

Pro umgesetztes Molekül Sauerstoff, werden vier H^+ -Ionen von der Matrix in den Intermembranraum gepumpt. Der genaue Mechanismus dieses Vorgangs ist allerdings noch nicht geklärt [48].

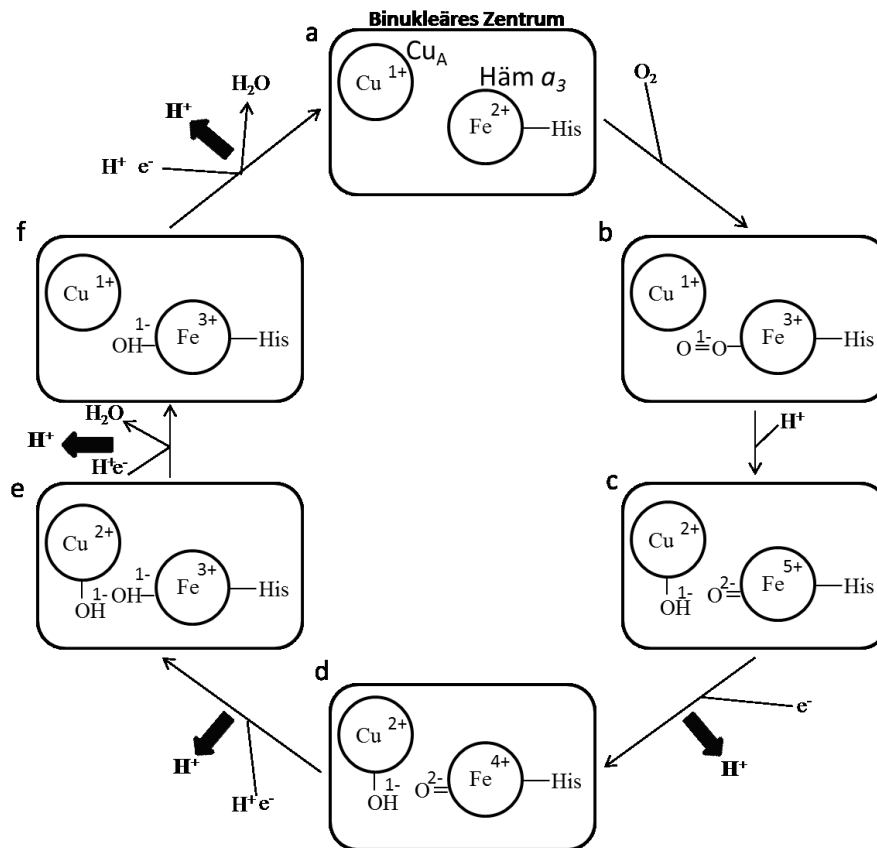


Abbildung 7: Die unterschiedlichen Zustandsformen des BNZ im Komplex IV während der Reduktion von Sauerstoff. a: Ausgangszustand des BNZ. Das zentrale Cu-Ion von Cu_A ist einfach positiv geladen und das zentrale Fe-Ion des an Histidin gebundenen Häm a_3 ist zweifach positiv geladen. b: Sauerstoff bindet an Häm a_3 und oxidiert Fe^{2+} zu Fe^{3+} . c: Ein Sauerstoffatom wird auf das Cu_A übertragen und bildet mit einem H^+ -Ion aus der Matrix eine Hydroxygruppe. Fe^{3+} wird dabei zu Fe^{5+} oxidiert. d: Fe^{5+} wird durch ein Elektron des Cytochrom c zu Fe^{4+} reduziert. e: Durch die Aufnahme eines weiteren Elektrons und eines H^+ -Ions entsteht auch an Häm a_3 eine Hydroxygruppe und Fe^{4+} kann wieder zu Fe^{3+} reduziert werden. f: Nach Aufnahme eines weiteren Elektrons und eines H^+ -Ions reagiert die Hydroxygruppe an Cu_A zu Wasser und Cu_A geht wieder in den Grundzustand über. f: Die Hydroxygruppe an Häm a_3 reagiert mit einem Elektron und einem H^+ -Ion zu Wasser, wodurch auch Häm a_3 in den Grundzustand übergeht. Bei den letzten vier Reaktion wird jeweils ein H^+ -Ion von der Matrix in den Intermembranraum gepumpt (Adaption nach S. Nakashima et al. [46])

1.2.3.4 ATP-Synthase

Die ATP-Synthase, auch als Komplex V bezeichnet, arbeitet als molekularer Motor, indem die protonenmotorische Kraft des durch die Atmungskette erzeugten MMP genutzt wird um ADP zu phosphorylieren. Der Komplex setzt sich aus 17 Untereinheiten zusammen und unterteilt sich in den in der Matrix gelegenen F_1 - und den in der Membran gelegenen F_0 -Teil

[49]. Der F_1 -Teil besteht aus einem $\alpha_3\beta_3$ Hexamer und einer zentralen Achse, die von den Untereinheiten γ , δ und ϵ gebildet wird. Die zentrale Achse des F_1 -Teils ist an den c-Oligomer des F_0 -Teils gebunden. Dieser besteht aus zwölf c-Untereinheiten. Über weitere Untereinheiten werden der F_0 - und der F_1 -Teil in Form einer peripheren Achse stabilisiert (Abbildung 8) [50].

Wenn Protonen getrieben vom MMP die Nahtstelle zwischen Untereinheit a und c-Oligomer passieren, kommt es zur Rotation des c-Oligomers und der zentralen Achse des F_1 -Teils. Dies hat zyklische Konformationsänderungen am $\alpha_3\beta_3$ Hexamer zur Folge. Dabei befinden sich die drei β -Untereinheiten immer in unterschiedlicher Konformation zueinander. Die Konformationszustände, die die β -Untereinheiten einnehmen, werden O-, L- oder T-Form genannt. In der L-Form bindet die β -Untereinheit ADP und freies Phosphat, in der T-Form wird die Reaktion zu ATP katalysiert und in der O-Form wird ATP freigesetzt [51]. Bei einer vollständigen Umdrehung der zentralen Achse werden demnach drei Moleküle ATP erzeugt. Dafür müssen neun bis zwölf H^+ -Ionen vom Intermembranraum über die ATP-Synthase in die Matrix zurück strömen [52].

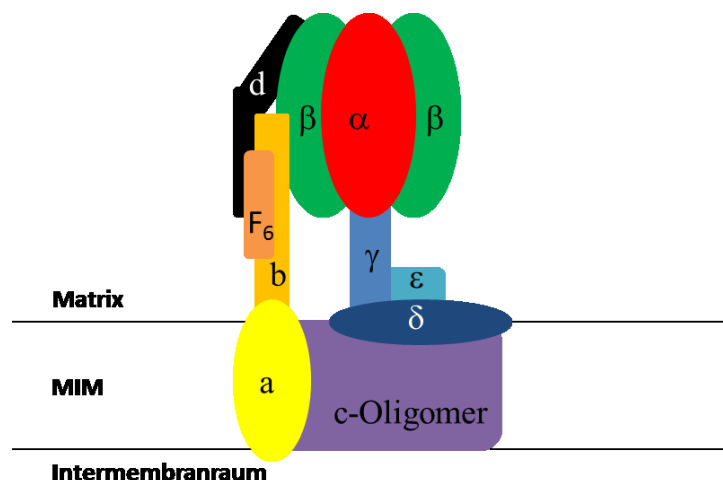


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Struktur der ATP-Synthase: Das $\alpha_3\beta_3$ Hexamer und die Untereinheiten γ , δ und ϵ bilden den F_1 -Teil. Das c-Oligomer besteht aus zwölf c-Untereinheiten und bildet u.a. mit der a- und der b-Untereinheit den F_0 -Teil. Die d- und die F_6 -Untereinheiten sind Bestandteile der peripheren Achse.

1.3 Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind sauerstoffhaltige hochreaktive Moleküle. Zu ihnen zählen z.B. Superoxidanionen, Hydroxyl-Radikale, Wasserstoffperoxid oder Peroxynitrit. Die Bildung von ROS ist ein natürlicher Prozess der Zellatmung und ist wichtig für die Aufrechterhaltung verschiedener Zellfunktionen. Sie fungieren als Initiatoren verschiedener

Signaltransduktionswege, dienen der Verteidigung gegen eindringende Mikroorganismen und fördern die Genexpression bestimmter für Zellwachstum verantwortlicher Gene. Allerdings sind ROS in erhöhter Konzentration stark zellschädigend, da sie mit Proteinen, Nukleinsäuren oder Lipiden der Zelle reagieren können [53]. In hoher Konzentration reagieren ROS besonders mit den Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan, Histidin und Cystein. Daher sind Proteine, die reich an diesen Aminosäuren sind besonders anfällig. Durch Reaktionen mit ROS kann die Konformation von Proteinen verändert und somit deren Funktion beeinträchtigt werden [54]. Des Weiteren kann eine erhöhte ROS-Konzentration zu gesteigerter mitochondrialer Permeabilität und der Freisetzung von Cytochrom *c* aus der MIM führen. Freies Cytochrom *c* ist ein proapoptotischer Faktor, welcher Apoptose über den intrinsischen Weg einleiten kann. Aufgrund dieser zellprotektiven und zellschädigenden Wirkungen ist eine Kontrolle der ROS-Konzentration in der Zelle von großer Bedeutung [55].

ROS entstehen in Form von Superoxidanionen primär an Komplex I und III der mitochondrialen Atmungskette. Diese können spontan mit Stickstoffmonoxid zu hoch reaktivem und für die Zelle sehr gefährlichen Peroxynitriten reagieren [56]. Superoxiddismutasen katalysieren die Reaktion von Superoxidionen zu Wasserstoffperoxid. Dieses kann ins Cytosol oder den Zellkern diffundieren und als Signalmolekül für redoxsensitive Stoffwechselwege fungieren. Allerdings kann in Anwesenheit reduzierter Übergangsmetalle, wie z.B. Fe^{2+} oder Cu^{2+} , Wasserstoffperoxid zu Hydroxyl-Radikalen reagieren [57]. Diese gehören zu den toxischsten Radikalen in biologischen Systemen [58]. Über die in Mitochondrien und Cytosol lokalisierte Glutathionperoxidase und über die in Peroxisomen und Cytosol lokalisierte Katalase kann Wasserstoffperoxid abgebaut werden.

Es wird angenommen, dass in eukaryotischen Zellen über 90 % der ROS in Mitochondrien erzeugt werden [59]. In Komplex I gibt es zwei Bereiche an denen ROS entstehen können. Zum einen ist dies die FMN-Bindungsstelle. Ist hier FMN völlig reduziert ist, kann ein Elektron auf Sauerstoff übertragen werden, wodurch ein Superoxidanion entsteht. Das entstandene instabile Flavinradikal gibt ein weiteres Elektron an die Eisen-Schwefel-Zentren des Komplex I ab. Somit ist die ROS-Produktion an der FMN-Bindungsstelle vom Reduktionsgrad von FMN und somit auch von der NADH/NAD^+ -Ratio in der Zelle abhängig [60]. Allerdings ist unter normalen physiologischen Konditionen der Reduktionsgrad des FMN und somit auch die ROS-Produktion eher gering [61]. Der zweite Bereich an dem ROS an Komplex I produziert werden kann ist die Ubichinon-Bindungsstelle. Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte ROS-Produktion beim entgegengesetzten Elektronentransport von

Ubichinol auf NAD^+ an Komplex I entsteht. Die Ubichinon-Bindungsstelle scheint daher der primäre Ort der ROS-Produktion an Komplex I zu sein [61].

An Komplex III ist die Ubichinon-Bindungsstelle Q_0 der Ort erhöhter ROS-Produktion. Es konnte gezeigt werden, dass eine stark erhöhte ROS-Produktion eintritt, wenn Antimycin A anwesend ist [62]. Antimycin A ist ein Inhibitor der mitochondrialen Atmungskette, der den Elektronentransfer in Komplex III von Häm b_L auf die Ubichinon-Bindungsstelle Q_i blockiert. Entsprechend entsteht an Q_0 vermehrt Ubisemichinon, welches wiederum ein Elektron auf Sauerstoff übertragen kann [63]. Die Bedeutung der ROS Erzeugung an Q_0 des Komplex III ist noch nicht genau geklärt. Es wird allerdings spekuliert, dass unter physiologischen Bedingungen dies der primäre Ort der ROS-Produktion ist [62].

Interessanterweise ist an Komplex IV der Grad der ROS-Produktion sehr gering [64]. Dies ist insofern bemerkenswert, dass am BNZ des Komplex IV Elektronen direkt auf Sauerstoff übertragen werden. Die Reduktion von Sauerstoff mit vier Elektronen und die Freisetzung von Wasser am BNZ ist demnach sehr effektiv (siehe Punkt 1.2.3.3).

An Komplex II ist die ROS-Produktion ebenfalls minimal [61]. Ursache hierfür ist ein Häm b -Molekül an der Ubichinonbindungsstelle. Sollte die Bindungsstelle des Ubichinon nicht besetzt sein, können Elektronen vorerst auf Häm b übertragen werden. Dies verringert die Wahrscheinlichkeit, dass Elektronen von reduziertem FADH_2 auf freien Sauerstoff übertragen werden und ROS in größerer Menge entstehen [65].

Neben Komplex II gibt es auch Seiteneinstiege der mitochondrialen Atmungskette, die bei der mitochondrialen ROS-Produktion von Bedeutung sind. Dies ist bei den Seiteneinstiegen über die Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (GPDH) [66] und die ETF-Ubichinon-Oxidoreduktase (ETFQOR) [67] zu beobachten. GPDH ist in der MIM lokalisiert und katalysiert die Oxidation von Glycerin-3-phosphat aus dem Intermembranraum zu Dihydroxyacetonphosphat. Elektronen und H^+ -Ionen werden auf FAD und dann auf Ubichinon übertragen. Im Gegensatz zu anderen Enzymen bzw. Enzymkomplexen führt die GPDH Elektronen aus dem Cytosol und nicht aus der Matrix der Atmungskette zu. Die ETFQOR ist ebenfalls in der MIM lokalisiert und überträgt Elektronen vom Elektronentransferierenden Flavoprotein (ETF) auf Ubichinon. ETF ist ein lösliches Protein der Matrix, welches an vielen Reaktionen des mitochondrialen Stoffwechsels beteiligt ist.

In der mitochondrialen Matrix können ROS am α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex (OGDC) und der Pyruvatdehydrogenase (PDH) entstehen [68]. Die PDH katalysiert in der

Matrix die Reaktion von Pyruvat zu Acetyl-CoA während die OGDC die Reaktion von α -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA im Citratzyklus katalysiert [12].

Mitochondrial erzeugte Superoxidionen werden primär in die Matrix abgegeben. Lediglich an Komplex III und der GPDH gelangen Superoxidionen auch direkt in den Intermembranraum [61].

Außerhalb von Mitochondrien können ROS z.B. an Cytochrom P450 und an der NADPH-Oxidase, welche in der Plasmamembran lokalisiert ist, generiert werden [69]. Außerdem entsteht in Peroxisomen H_2O_2 bei der peroxisomalen β -Oxidation sehr langkettiger Fettsäuren (VLCFA, $C > 20$) [70]. Beim von der peroxisomalen Katalase katalysierten Abbau des H_2O_2 können toxische Moleküle wie z.B. Phenole, Ameisensäure, Formalaldehyd oder Alkohole oxidiert und so entgiftet werden [71].

1.4 Antioxidative Verteidigung

Die antioxidative Verteidigung in der Zelle kann direkt durch den Abbau von ROS mittels antioxidativer Enzyme erfolgen. Des Weiteren kann die ROS-Produktion in der Atmungskette über die Intensität des mitochondrialen Metabolismus reguliert werden. Auch entkoppelnde Enzyme in der mitochondrialen Innenmembran können die Produktion von ROS verringern. Durch Teilungs- und Fusionsprozesse der Mitochondrien können durch ROS entstandene defekte mitochondriale Strukturen separiert und durch Mitophagie beseitigt werden.

1.4.1 Antioxidative Enzyme

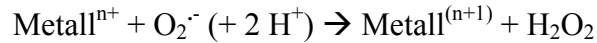
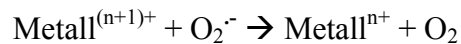
Antioxidative Enzyme sind z.B. die Superoxiddismutasen 1 und 2 (SOD1/2), die Katalase, die Glutathionperoxidase (GPx) oder auch das Parkinson Protein 7 (DJ1).

1.4.1.1 Superoxiddismutasen

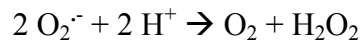
Der Abbau von Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid wird von SODs katalysiert [72]. Abhängig von Cofaktoren in Form von Metallionen sind vier Isoformen bekannt. Dies sind die Eisen-SOD (FeSOD), die Mangan-SOD (MnSOD; SOD2), die Kupfer-Zink-SOD (CuZnSOD; SOD1) und die Nickel-SOD (NiSOD). In Prokaryoten können alle vier Formen vorkommen, wohingegen in Säugetieren lediglich die SOD1 und die SOD2 von Bedeutung sind. Während SOD2 die typische Superoxiddismutase der Mitochondrien ist, kommt SOD1 vorwiegend im Cytoplasma der Zelle und im Extrazellularraum vor [73].

SODs bauen Superoxidanionen nach einem sogenannten „Ping-Pong-Mechanismus“ ab. Dies bedeutet, dass das Metallzentrum des Enzyms abwechselnd reduziert und oxidiert wird.

Entsprechend werden auch die Superoxidanionen während der Reaktion entweder oxidiert oder reduziert [73]. Die Reaktionen laufen nach folgendem Schema ab:

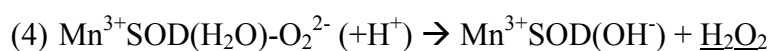
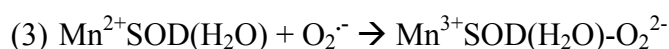
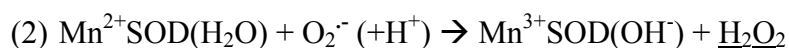
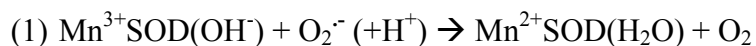


Zusammengefasst läuft demnach folgende Reaktion ab:



SOD1 ist ein dimeres Enzym. Jedes der beiden Monomere beinhaltet ein aktives Zentrum mit einem Kupfer- und einem Zinkion. Diese sind über einen Imidazolring der Aminosäure Histidin miteinander verbunden. Das redoxaktive Metallion ist Kupfer. Dessen Oxidationsgrad nimmt während der katalytischen Reaktion mit den Superoxidanionen die Zustände Cu^{2+} und Cu^{3+} ein. Das Zinkion ist wichtig für die Stabilität des Enzyms. Des Weiteren ermöglicht es eine konstante Aktivität des Enzyms über einen weiten pH-Bereich. Für die entsprechende Konformation der Ionen im aktiven Zentrum ist das Kupferion an drei weitere Histidinreste und ein Wassermolekül gebunden, während das Zinkion noch an zwei weitere Histidinreste und an einen Aspartatrest gebunden ist [74].

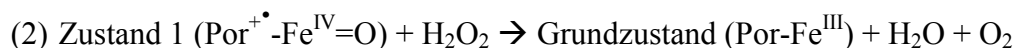
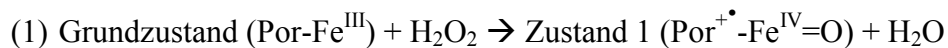
Die SOD2 ist ein evolutionär hoch konserviertes Enzym. In Eukaryoten kommt sie vor allem als Tetramer vor. Jedes Monomer beinhaltet ein einzelnes Manganion im aktiven Zentrum. Dieses ist an drei Histidinresten und einem Aspartatrest gebunden. Des Weiteren ist, abhängig vom Oxidationsgrad, Wasser oder ein Hydroxidion an Mangan gebunden. Das gebundene Wassermolekül ist u.a. beim Protonentransfer an das Superoxidanion von Bedeutung [73]. Der Oxidationszustand des Manganions kann die Zustände Mn^{3+} und Mn^{2+} einnehmen. Der Mechanismus der SOD2 unterscheidet sich von der SOD1, da reduziertes SOD2 Superoxidionen über zwei verschiedene Reaktionswege verstoffwechseln kann [75]. Im Folgenden sind die Reaktionsgleichungen dargestellt [73]:



In Gleichung (3) wird der Enzym-Substrat-Komplex $\text{Mn}^{3+}\text{SOD}(\text{OH}^-)\text{-O}_2^{2-}$ gebildet. Die Geschwindigkeitskonstante der Gleichung (4) ist relativ gering. Entsprechend wird beim katalytischen Abbau von Superoxidanionen über die SOD2 zwischen einer „burst- Phase“ und einer „zero-order-Phase“ unterschieden [75]. Dies bedeutet, dass bei erhöhter Superoxidionenkonzentration in der Zelle deren Abbau zu Beginn sehr schnell erfolgt, während kurz danach die Konzentration deutlich langsamer abnimmt. Durch diesen Mechanismus soll ein übermäßiger Anstieg der Konzentration von Wasserstoffperoxid in der Zelle vermieden werden. Dies ist insofern wichtig, als dass schon geringe Unterschiede in der Wasserstoffperoxidkonzentration Zellproliferation oder Apoptose initiieren können [76].

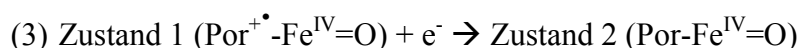
1.4.1.2 Katalase

Die Katalase der Säugetiere ist ein Homotetramer mit einer molekularen Masse von ca. 60 kDa pro Untereinheit [77]. Die Untereinheiten besitzen als prosthetische Gruppe Häm *b* im aktiven Zentrum. Ähnlich der katalytischen Reaktionen der SODs wird die Fe-Protoporphyrin IX-Struktur des Häm *b* in einer ersten Reaktion mit Wasserstoffperoxid oxidiert. Dabei entsteht ein π -kationisches Porphyrinradikal am Enzym. In einer folgenden Reaktion wird das Porphyrinradikal durch Wasserstoffperoxid reduziert und die Katalase geht wieder in den Grundzustand über. Die beiden Reaktionen sind im Folgenden dargestellt [78]:



Demnach katalysiert die Katalase insgesamt die Reaktion von zwei Molekülen Wasserstoffperoxid zu zwei Molekülen Wasser und einem Molekül Sauerstoff.

Allerdings kann das oxidierte Porphyrinradikal im Zustand 1 in Gleichung (1) auch spontan von einem Elektron reduziert werden. Dies ist in Gleichung (3) dargestellt [78]:



Der in Gleichung (3) entstandene Zustand 2 ($\text{Por-Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) ist katalytisch inaktiv und geht nur sehr langsam wieder in die aktive Form des Enzyms über. Allerdings kann die Katalase Verbindungen mit NADPH eingehen, welche die Erzeugung dieses Zustandes unterbinden

[78]. Gebundenes NADPH kann das Porphyrinradikal im Zustand 1 auch direkt reduzieren, wodurch die Katalase in den Grundzustand überführt wird. Dies ist bei niedriger Wasserstoffperoxidkonzentration in der Zelle von Bedeutung, da der hoch reaktive Zustand des Porphyrinradikals nicht lange erhalten bleiben soll. Sowohl bei Glutathionperoxidasen als auch bei Katalasen ist demnach NADPH/H⁺ als Cofaktor von Bedeutung [79].

1.4.1.3 Glutathionperoxidasen

Wasserstoffperoxid kann im Cytosol und in der mitochondrialen Matrix auch von Glutathionperoxidasen (GPx) abgebaut werden [80]. Zur Reduktion von Peroxiden wird das schwefelhaltige Peptid Glutathion (GSH) als Cofaktor benötigt. Dabei fungiert GSH als reduzierendes Substrat [81]. Im aktiven Zentrum trägt die GPx Selenocystein. Wasserstoffperoxid reagiert im ersten Reaktionsschritt mit dem Selenolrest (GPx-SeH) des Selenocysteins (Abbildung 9). Dabei entsteht im GPx-Molekül Selenensäure (GPx-SeOH) und Wasserstoffperoxid wird zu Wasser reduziert. Die Selenensäure reagiert zunächst mit GSH zum Selenylsulfid (GPx-SeSG), um dann mit einem zweiten GSH-Molekül das Selenocystein zu regenerieren [82]. Das bei letzterer Reaktion entstandene Glutathion-Disulfid (GSSG) kann wieder über die Glutathion-Reduktase und NADPH/H⁺ als Cofaktor zu zwei Molekülen GSH reduziert und dadurch regeneriert werden [83].

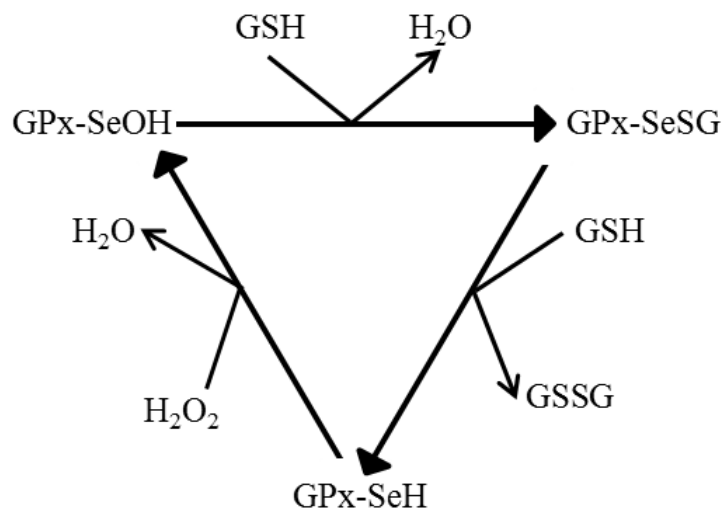


Abbildung 9: Reaktionszyklus der Glutathionperoxidase. -SeH: Selenocystein, -SeOH: Selenensäure, -SeSG: Selenylsulfid, GPx: Glutathion-Peroxidase, GSH: Glutathion, GSSG: Glutathion-Disulfid.

1.4.1.4 Parkinson Protein 7

Ein weiteres wichtiges Enzym der oxidativen Verteidigung ist das Parkinson Protein 7 (DJ1). Dieses homodimere Protein hat eine molekulare Masse von ca. 20 kDa pro Untereinheit [84, 85] und kommt vor allem im Cytoplasma vor, wobei es nach einsetzendem oxidativen Stress auch in Mitochondrien [86] und im Zellkern vorzufinden ist [87].

DJ1 kann bei oxidativem Stress sowohl als Peroxidase fungieren als auch die Transkription anderer antioxidativer Enzyme regulieren [58]. Der genaue Mechanismus bei der Reduktion von Wasserstoffperoxid ist noch nicht bekannt. Voraussichtlich ist die Oxidation von Cysteinresten in beiden Untereinheiten dabei von Bedeutung. So kommt es zu einer hohen Oxidationsrate von Cystein 106 in beiden Untereinheiten bei einer hohen Wasserstoffperoxidkonzentration in der Zelle [88].

Die Expression von *DJ1* wird bei oxidativem Stress induziert [89]. Anschließend induziert DJ1 selbst die Expression verschiedener antioxidativer Enzyme, wie z.B. SOD1. Die Aktivierung der Expression von *SOD1* erfolgt über den Erk1/2-Elk1 Signalweg. Dabei ist Elk1 ein Transkriptionsfaktor, der an der Promoterregion von *SOD1* binden kann und die *SOD1*-Genexpression induziert. Elk1 muss zuvor von der Kinase Erk1/2 im Zellkern phosphoryliert und somit aktiviert werden. In den Zellkern gelangt Erk1/2 im Komplex mit DJ1, welches mit Erk1/2 interagieren kann und so dessen Translokation aus dem Cytoplasma vermittelt [90].

1.4.2 Entkoppelnde Proteine und mitochondriale Metabolismusrate

In Mitochondrien aus dem Gehirn von Ratten konnte gezeigt werden, dass die ROS-Produktion durch den NADH-Redoxzustand und das MMP kontrolliert wird. Die Generierung von ROS ist dabei umso höher, je höher die NADH/NAD⁺-Ratio und das MMP ist [91]. Entsprechend ist die ROS-Produktion vom mitochondrialen Metabolismus abhängig. Außerdem konnte beobachtet werden, dass ein leichtes Absenken des MMP die ROS-Produktion verringern kann, während die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung kaum beeinflusst wird. Folglich kann ein leichtes Entkoppeln der Atmungskette eine erste Verteidigungsstrategie gegen oxidativen Stress sein [92]. Diese Beobachtung geht mit der „uncoupling to survive“ Hypothese einher, welche besagt, dass Protonen separat von der mitochondriale ATP-Synthase vom Intermembranraum in die Matrix gelangen können, um die mitochondriale ROS-Produktion zu verringern [93]. Hintergrund des Entkoppelns ist eine Verringerung des Anteils reduzierter Komponenten innerhalb der Atmungskette. Dies

wiederum verringert die Wahrscheinlichkeit, dass es in der Atmungskette abseits des Komplex IV zu einem Elektronentransfer auf Sauerstoff kommt [94]. Eine entkoppelnde Funktion innerhalb der MIM wird u.a. den Uncoupling Proteinen 1, 2 und 3 (UCP1, 2, 3) zugeschrieben. Während UCP1 hauptsächlich in braunem Fettgewebe und UCP3 in braunem Fettgewebe und der Skelettmuskulatur vorkommt, wird UCP2 in vielen Geweben des Körpers exprimiert. Die verschiedenen UCP-Isoformen weisen eine hohe Sequenzhomologie auf [95]. Der Protonenfluss über UCPs kann von verschiedenen Aktivatoren oder Inhibitoren gesteuert werden. Dabei können ROS bzw. ROS-Derivate selbst UCPs aktivieren und so durch negative Rückkopplung die ROS-Produktion verringern [96, 97]. Besonders das ungesättigte Aldehyd 4-Hydroxy-2-Nonenal (4-HNE) soll den Protonenfluss über UCPs positiv beeinflussen können. Dieses hoch toxische und elektrophile Molekül entsteht bei einer durch Superoxidanionen verursachten Lipidperoxidation [97]. Ein entscheidendes Molekül bei der Regulierung der Aktivität der UCPs ist Glutathion. Bei geringem oxidativen Stress und gemäßigttem MMP bindet Glutathion an Cysteinresten der UCPs, wodurch diese inaktiviert werden. Liegt allerdings eine Stoffwechsellage mit erhöhtem oxidativen Stress und erhöhtem MMP vor, wird eine Deglutathionylation an den Cysteinresten induziert, wodurch die UCPs aktiviert werden und ein von der ATP-Synthase unabhängiger Protonenfluss in die Matrix stattfinden kann [94].

UCP1 scheint keinen großen Einfluss auf die mitochondriale ROS-Produktion zu haben. So war in braunem Fettgewebe von UCP1-Knockout-Mäusen keine Veränderung der ROS-Produktion zu beobachten [98]. Entsprechend ist die primäre Funktion von UCP1 in kalter Umgebung im braunen Fettgewebe eine zitterfreie Thermogenese herbeizuführen [99]. Ein Einfluss von UCP2 und UCP3 auf die mitochondriale ROS-Produktion konnte hingegen gezeigt werden. So wurde nachgewiesen, dass diese bei einer Überexpression von *UCP2* verringert war [100], während sie in UCP2-Knockout-Mäusen erhöht war [101]. Der gleiche Effekt war auch bei UCP3 zu beobachten [102, 103].

1.4.3 Mitochondriale Dynamik, Mitophagie und Apoptose

Wie in Abschnitt 1.3 beschrieben kann durch ROS erzeugter oxidativer Stress u.a. DNA, Proteine und Lipide in den Mitochondrien schädigen. Entsprechend können spontan Mutationen im mitochondrialen Genom entstehen, wodurch es zu einer Vermischung wildtypischer und mutierter mtDNA in den Mitochondrien einer Zelle kommen kann. Durch Fusionsprozesse kommt es zur Verteilung der mutierten mtDNA und auch anderen defekten

Strukturen im Netzwerk. Solange der Anteil wildtypischer mtDNA in einzelnen Mitochondrien höher als 80–90 % ist, können Defekte, die von mutierter mtDNA hervorgerufen werden, kompensiert werden [104]. Interessanterweise sind jedoch auch mitochondriale Teilungsprozesse äußerst wichtig als Reaktion auf oxidativen Stress. So kommt es nach der Teilung eines Mitochondriums in den entstandenen Tochtermitochondrien zu einer Art „Stresstest“. Dieser führt zu einer verstärkten Depolarisation eines Tochtermitochondriums, sollte dessen Funktion aufgrund beschädigter Strukturen stark beeinträchtigt sein [104]. Diese Depolarisation führt wiederum zu einer Mitophagie. Dabei werden geschädigte Mitochondrien von Autophagosomen umschlossen und zu Lysosomen transportiert, wo sie letztendlich abgebaut werden [105]. Mitophagie wird von der Kinase PINK1 und der Ligase Parkin eingeleitet. Eine Anhäufung von PINK1 wird normalerweise in gesunden Mitochondrien unterdrückt, indem PINK1 in die MIM transportiert und dort von der Protease PARL abgebaut wird. In Mitochondrien mit depolarisiertem MMP wird PINK1 jedoch nicht in die MIM transportiert und akkumuliert an der MAM. Dort wiederum rekrutiert es Parkin aus dem Cytosol, welches die autophagische Degradation dieser Mitochondrien induziert [106].

Ob das mitochondriale Netzwerk verstärkt mit mitochondrialer Teilung oder Fusion auf oxidativen Stress reagiert, ist abhängig von der Intensität des Stresses. Sind mitochondriale Komponenten lediglich geringfügig beschädigt, kann dies durch erhöhte mitochondriale Fusion über das Verdünnungsprinzip kompensiert werden. Sind Mitochondrien jedoch stark beschädigt, werden vermehrt mitochondriale Teilungsprozesse eingeleitet, um diese via Mitophagie zu beseitigen. Dies ist notwendig, um zu verhindern, dass stark beschädigte Mitochondrien wieder Teil des mitochondrialen Netzwerkes werden [104]. Um effektiv und selektiv beschädigte mitochondriale Strukturen beseitigen zu können, müssen Mitochondrien in der Lage sein, sich asymmetrisch zu teilen. Dies bedeutet, dass defekte Strukturen primär an ein Tochtermitochondrium weitergegeben werden. Ein genauer Mechanismus hierfür ist jedoch noch nicht bekannt. Außerdem ist noch nicht bekannt, ob auch mutierte mtDNA selektiv an ein Tochtermitochondrium weitergegeben werden kann [104].

Erreicht der zelluläre Stresslevel trotz aller Abwehrmaßnahmen einen kritischen Wert, wird intrinsische Apoptose einhergehend mit übermäßiger mitochondrialer Teilung ausgelöst. Dabei kommt es zu einer Translokation des proapoptotischen Proteins BAX vom Cytosol in die MAM. Dies hat wiederum die Freisetzung von Cytochrom *c* zur Folge, was letztendlich Apoptose initiiert. Auch DNM1L (siehe Punkt 1.2.2) ist während der Apoptose von

Bedeutung. Durch Apoptose-Stimuli lagert sich dieses vermehrt an der äußeren mitochondrialen Membran an, was die gesteigerte mitochondriale Teilung während der Apoptose erklärt [107]. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen mit in der Aktivität beeinträchtigtem DNM1L resistent gegen durch Wasserstoffperoxid induzierte Apoptose sind [108].

Interessanterweise ist PINK1 auch zum Schutz vor Apoptose von Bedeutung. So aktiviert es durch Phosphorylierung TRAP1. Dies ist ein Chaperon, welches der Cytochrom *c* Freisetzung nach oxidativem Stress entgegenwirkt und so die Zelle vor Apoptose schützt [109].

1.5 Einfluss von ROS und mtDNA-Mutationen auf den Alterungsprozess

Es wird diskutiert, inwieweit mtDNA-Mutationen den Alterungsprozess beeinflussen. Die Analyse verschiedener Gewebe zeigte, dass sich besonders in postmitotischem Gewebe, wie dem Muskel oder dem Gehirn, mtDNA-Mutationen im Alter anhäufen. Allerdings ist noch nicht geklärt, ob dies Ursache oder Folge von Alterung ist [110]. Somatische spontan auftretende mtDNA-Mutationen führen in der Zelle zu einem heteroplasmatischen Zustand. Dies bedeutet, dass innerhalb der Zelle sowohl wildtypische- als auch mutierte mtDNA-Kopien vorliegen [111]. Wird ein Grenzwert der Häufigkeit von mtDNA-Mutationen in der Zelle überschritten, kommt es zu einer Beeinträchtigung des Energiemetabolismus. Davon sind vor allem Gewebe mit hohem Energiebedarf betroffen [112]. Eine Anhäufung von mtDNA-Mutationen im Alter konnte in verschiedenen Geweben von Menschen [113], Affen [114] und Mäusen [115] nachgewiesen werden.

Zahlreiche Krankheiten können Ursache für Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen im mitochondrialen Genom sein. MtDNA-Mutationen können sowohl vererbt werden als auch spontan auftreten. Vererbten Mutationen werden u.a. mit Diabetes mellitus und Taubheit in Verbindung gebracht [116]. Spontane Deletionen der mtDNA stehen z.B. in Zusammenhang mit progressiver externer Ophthalmoplegie (PEO) und dem Kearns-Sayre Syndrom [117]. Mitochondriale Punktmutationen sind z.B. Ursache von Enzephalomyopathie, Laktatacidose und schlaganfallähnliche Episoden (MELAS) [118], von Neuropathie, Ataxie, und Retinitis pigmentosa (NARP) [119], von Leber Optikusatrophie (LHON) [120] und dem Leigh Syndrom [121].

Auch degenerative Krankheiten können ihre Ursache in mtDNA-Mutationen haben, da sie z.B. zu bioenergetischen Fehlfunktionen in neuronalem Gewebe führen. Dies kann zu einer verringerten Energieproduktion führen, was wiederum die neuronale Funktionen

beeinträchtigt [122]. Entsprechend kommt es bei neurodegenerativen Krankheiten zu einem zunehmenden Verlust von Neuronen durch Apoptose oder Nekrose. Die Parkinson-Krankheit, die Alzheimer-Krankheit, die Huntington-Krankheit und Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) werden damit in Verbindung gebracht [57].

Die Rolle von ROS bei der Entstehung von mtDNA-Mutationen und Alterung ist noch nicht genau geklärt. Schon in den 1950ern entwickelte Denham Harman die „Theorie freier Radikale des Alterns“ [123]. Diese geht davon aus, dass die Generierung von ROS Ursache von Alterung ist. In einem „Teufelskreisprozess“ führt dabei die Produktion von ROS zur Schädigung mitochondrialer Komponenten wie z.B. der mtDNA, was wiederum zu einer Erhöhung der ROS-Produktion führt. Beobachtungen, die zu dieser Theorie geführt haben, sind eine Korrelation des chronologischen Alters und der Intensität der ROS-Generierung [124] und ein schrittweiser Verlust der mitochondrialen Funktion im Alter [125]. Des Weiteren sind z.B. Krebserkrankungen, Neurodegenerationen, Diabetes Mellitus Typ 2, chronische Entzündungen und Herz-Kreislauf-Erkrankung mit erhöhtem oxidativem Stress verknüpft [126]. Allerdings konnte in mehreren Experimenten eine deutlich verkürzte Lebensdauer aufgrund erhöhten oxidativen Stresses nicht nachgewiesen werden. So führte gar eine Knockout Mutation der SOD2 (siehe Punkt 1.4.1.1) in *C. elegans* zwar zu erhöhtem oxidativem Stress aber auch zu einer verlängerten Lebensdauer [127]. Auch in Mäusen mit einer fehlerhaften Kopie des *SOD2* Gens (*SOD2*^{+/-}) konnte erhöhter oxidativer Stress, aber keine verkürzte Lebensdauer im Vergleich zu wildtypischen Mäusen festgestellt werden [128]. Einhergehend mit der „Theorie freier Radikale des Alterns“ des Alterns, hätte jedoch eine erhöhte ROS-Produktion schnelleres Altern und eine verkürzte Lebensspanne zur Folge haben sollen. Aufgrund dieses Widerspruches geht Siegfried Hekimi [126] davon aus, dass eine gesteigerte ROS-Produktion im Organismus nicht Ursache, sondern Folge von Alterungsprozessen ist. Daher entwickelte er die Hypothese der graduellen ROS-Antwort. Demnach fungiert ROS als Signalmolekül für altersbedingten Stress, der durch die Anhäufung geschädigter Komponenten in den Zellen bedingt ist. Als Antwort auf diesen Stress leiten ROS als sekundärer Botenstoffe zellprotektive biochemische Stoffwechselwege ein. Trotzdem kann über diesen Mechanismus der graduelle Anstieg altersbedingter Schädigung der Zelle lediglich verlangsamt, nicht jedoch aufgehalten werden. Aufgrund der zunehmenden Schädigung der Zelle im Alter, nehmen nach dieser Hypothese auch der Grad der Stimulation von zellprotektiven Stoffwechselwegen und demnach auch die ROS-Produktion im Alter zu. Diese Theorie schließt mit ein, dass mit fortschreitendem Alter und

fortschreitender Zellschädigung die ROS-Konzentration soweit ansteigt, dass die zellschädigenden Eigenschaften der ROS überwiegen [126]. Demnach setzt der von Harman beschriebene „Teufelskreisprozess“ bezüglich der ROS-Generation nach dieser Theorie erst in höherem Alter ein.

1.6 Calcium – Universeller Botenstoff der Zelle

Calcium dient in der Zelle in vielen Prozessen als sekundärer Botenstoff, indem es diverse Informationen innerhalb einer Zelle weitergibt und so deren Aktivität kontrolliert. So sind Ca^{2+} -Ionen bei Muskelkontraktionen, der Informationsverarbeitung im Gehirn, der allgemeinen Entwicklung und Differenzierung von Zellen und dem Zelltod von Bedeutung [129]. Außerdem reguliert es die oxidative Phosphorylierung in Mitochondrien [130]. Pathologisch hohe Calciumkonzentration lösen jedoch Apoptose aus [131].

In der ruhenden Zelle beträgt die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration weniger als 10^{-4} mmol/l, während sie im Extrazellularraum bei 1,7 mmol/l liegt. Dadurch besteht an der Plasmamembran ein zelleinwärts gerichteter Ca^{2+} -Gradient. Nach physiologischen Stimuli kann die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration um den Faktor 10–100 ansteigen. Dabei kann Calcium aus dem Extrazellularraum oder aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern einströmen [14]. Innerhalb der Zelle fungiert besonders das endoplasmatische Retikulum (ER) als interner Calciumspeicher, über den die Calciumkonzentration im Cytosol reguliert werden kann [132].

1.6.1 Calcium als Regulator der oxidativen Phosphorylierung

Sowohl intramitochondriales als auch extramitochondriales Calcium kann die Zellatmung auf verschiedenen Ebenen stimulieren.

Intramitochondriales Calcium kann konzentrationsabhängig die Aktivität des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes (PDC) und im Citratzyklus die Aktivität der Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH) sowie der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (α -KGDH) stimulieren [133, 134]. In Säugetieren wird der PDC durch die Pyruvatdehydrogenase-Kinase (PDK) vermittelte Phosphorylierung an drei Aminosäuren der E1 Untereinheit reversibel gehemmt [135]. Die Pyruvatdehydrogenase Phosphatase (PDP) wiederum kann den PDC dephosphorylieren und somit wieder aktivieren. Dabei wird die Aktivität der PDP von Calcium stimuliert [136]. Die Aktivität der α -KGDH und der ICDH wird von Calcium insbesondere dann stimuliert, wenn α -Ketoglutarat (α -KG) bzw. Isocitrat (IC) in geringen Konzentrationen vorliegt [134, 137]. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Calcium die

Michaeliskonstante K_M für α -KG und IC reduziert, nicht aber die maximale Umsatzgeschwindigkeit V_{max} der Reaktion.

Extramitochondriales Calcium kann die Aktivität des Aspartat-Glutamat-Carrier (AGC) der MIM stimulieren. Dieser ist Bestandteil des Malat-Aspartat-Shuttles, welches NADH aus dem Cytosol in die Matrix transportiert und so der Atmungskette zuführt [130]. Im Säugetier sind die Isoformen Aralar und Citrin des AGC bekannt. Während Aralar überwiegend im Gehirn und Skelettmuskel vorkommt, ist Citrin die typische Isoform der Leber [138]. Eine stimulierende Wirkung von Calcium konnte für beide Isoformen nachgewiesen werden, wobei die Aralar Isoform deutlich sensibler auf Ca^{2+} reagiert. Die Calciumbindungsstellen befinden sich in beiden Isoformen an sogenannten EF-Hand Motiven, welche in den Intermembranraum hineinreichen [139].

Ein weiterer Carrier mit EF-Hand Motiv, der über Bindung mit cytosolischem Calcium reguliert wird, ist der ATP-Mg/Pi Carrier. Dieser transportiert ATP-Mg im Austausch gegen Phosphat in die Matrix und reguliert so die Adeninnukleotidkonzentration im Mitochondrium [140].

Auch die FAD-abhängige Glycerin-3-Phosphatdehydrogenase (FAD-GPDH) wird durch cytosolisches Calcium stimuliert [141]. Diese ist an der Außenseite der MIM lokalisiert und katalysiert die Reduktion von cytosolischem Glycerin-3-Phosphat (GP) zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP). Dabei wird FAD zu $FADH_2$ reduziert, welches die Elektronen wiederum auf Ubichinon überträgt und somit der Atmungskette verfügbar macht. Durch die cytosolische $NADH/H^+$ abhängige GPDH wird DHAP wieder zu GP reduziert. Cofaktor bei dieser Reaktion ist $NADH/H^+$. Wie beim Malat-Aspartat-Shuttle ist die Funktion des GPDH-Systems Elektronen von cytosolischem $NADH/H^+$, welches z.B. in der Glykolyse produziert wird, in die Atmungskette einzubringen [130]. Des Weiteren kann über die Synthese von NAD^+ im Cytosol die Oxidation von Glukose in der Glykolyse effektiv von statten gehen [142]. Bindet Calcium an der FAD-GPDH, wird die K_M deutlich geringer [143]. Die Bindungsstellen für Calcium befinden sich auch hier in einem EF-Hand Motiv [141].

1.6.2 Einfluss von Calcium auf ROS-Generierung und Apoptose

Sehr hohe cytosolische und mitochondriale Ca^{2+} -Konzentrationen, die durch einen pathologischen Stimulus induziert werden können, führen zu erhöhter ROS-Produktion und können Apoptose einleiten [144]. So führt eine erhöhte mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration zur Stimulierung der oxidativen Phosphorylierung (siehe 1.6.1) einhergehend mit generell

erhöhter ROS-Generierung der Atmungskette [131]. Des Weiteren stimuliert Calcium die katalytische Wirkung der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) und somit die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO). NO wiederum inhibiert Komplex IV, was eine erhöhte ROS-Produktion an Komplex III zur Folge hat [145]. ROS kann Cardiolipin in der inneren mitochondrialen Membran oxidieren, was zu einer Freisetzung von Cytochrom *c* führen kann. Dies wird zusätzlich durch Ca^{2+} -Ionen beschleunigt, indem sie mit Cytochrom *c* um die Cardiolipin-Bindungsstelle konkurrieren [146]. Entsprechend führt eine stark erhöhte Ca^{2+} -Konzentration im Intermembranraum zu einer verstärkten Freisetzung von Cytochrom *c*. Die Bildung und die Aktivierung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (PTP) wird ebenfalls durch eine stark erhöhte Ca^{2+} -Konzentration stimuliert. Diese setzt sich u.a. aus dem spannungsabhängigen und anionenselektiven Kanalprotein 1 (VDAC1) in der MAM, aus der Adenin-Nukleotid-Translokase (ANT) in der MIM und aus Cyclophilin D (Cyp-D) zusammen [147]. In geöffnetem Zustand ist diese für Moleküle von einer Größe bis zu 1500 kDa passierbar, wodurch die Permeabilität der mitochondrialen Innenmembran stark erhöht ist. Durch die PTP kann auch Cytochrom *c* in das Cytosol gelangen, wo es über Signalkaskaden Apoptose initiiert [131]. Außerdem führt Cytochrom *c* im Cytosol zusätzlich zu verstärkter Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem ER [148]. Pathologisch hohe mitochondriale Ca^{2+} -Konzentrationen werden z.B. mit neuronaler Exzitotoxizität [149] und postischämischen Reperfusionsschäden in Verbindung gebracht [150].

1.6.3 Calciumtransport durch die mitochondriale Doppelmembran

Die äußere mitochondriale Membran kann Calcium über den VDAC1 passieren. Dieser ist auch für viele mitochondriale Metaboliten wie z.B. ADP und ATP oder NADH passierbar [151]. Der Zustand des VDAC1 kann durch die Bindung von Calcium reguliert werden. So konnte gezeigt werden, dass Calcium in hoher Konzentration die Permeabilität des VDAC1 für ADP erhöht [152]. Über den mitochondrialen Calcium Uniporter (MCU) kann Ca^{2+} die MIM der Mitochondrien entlang seines elektrochemischen Gradienten passieren und in die Matrix gelangen. Dabei aktiviert Calcium selbst die Öffnung des MCU, während er von Nukleotiden und Magnesium inaktiviert wird [153]. Die Regulierung des MCU durch Ca^{2+} -Ionen erfolgt über die regulatorischen Einheiten „Mitochondrial Calcium Uptake“ 1 und 2 (MICU1, MICU2). Diese bilden über eine Disulfidbrücke eine dimere Struktur und interagieren mit dem MCU an der MIM. Die modulierenden Effekte von MICU1 und MICU2 auf den MCU sind entgegengesetzt in Bezug zu dessen Aktivität. So führt bei cytosolischer

Ca^{2+} -Konzentration im Ruhezustand die Interaktion von MICU2 mit dem MCU zur geschlossenen Konformation des Ca^{2+} -Kanals. Ist die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration hingegen erhöht, so bindet Calcium vermehrt an EF-Hand Motiven der beiden regulatorischen Einheiten. Die daraus resultierende Konformationsänderung des MICU1 induziert die Öffnung des MCU [154]. Entsprechend ist der MCU von großer Bedeutung bei der Verknüpfung der cytosolischen und intramitochondrialen Signalfunktion des Calciums. Auch der mitochondriale Carrier „Solute Carrier Family 25 Member 23“ (SLC25A23) steigert die mitochondriale Calciumaufnahme über den MCU, wobei der Regulationsmechanismus noch nicht aufgeklärt ist. Es wird spekuliert, dass die Regulation des MCU über einen SLC25A23/MCU/MICU1 Komplex erfolgen könnte. Interessanterweise wird SLC25A23 auch mit erhöhter ROS-Produktion und erhöhter Apoptoserate in Verbindung gebracht. Entsprechend wird angenommen, dass SLC25A23 einen Mechanismus induziert, welcher zu einer MCU-abhängigen mitochondrialen Überladung an Ca^{2+} -Ionen führt, wodurch Apoptose eingeleitet wird [155].

Der Transport von Ca^{2+} -Ionen aus der Matrix in den Intermembranraum findet in erster Linie am mitochondrialen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter (NCLX) statt [156].

1.7 Zielstellung

ROS entstehen überwiegend während der Zellatmung an den Atmungskettenkomplexen. Ihnen wird sowohl eine zellprotektive als auch eine zellschädigende Wirkung zugeschrieben. So leitet eine moderat erhöhte ROS-Produktion, die als Antwort auf beschädigte Strukturen innerhalb der Zelle gebildet werden, zellprotektive Stoffwechselwege ein. Andererseits wirken ROS selbst zellschädigend, indem sie mit Proteinen, Lipiden oder Nukleinsäuren reagieren und so deren Funktion beeinträchtigen können. Aufgrund dieser Eigenschaften ist es in der Zelle von großer Bedeutung die Produktion von ROS zu regulieren. Die antioxidative Verteidigung in der Zelle kann direkt durch den Abbau von ROS mittels antioxidativer Enzyme erfolgen. Auch kann die Intensität der ROS-Produktion über die Intensität des mitochondrialen Metabolismus reguliert werden und defekte mitochondriale Strukturen können via Mitophagie beseitigt werden.

Die Rolle von mtDNA-Mutationen bei der ROS-Synthese ist noch nicht genau geklärt. So wird diskutiert, inwieweit mtDNA-Mutationen Folge oder Ursache von ROS sind. Bekannt ist, dass es im Alter sowohl zu einer Anhäufung von mtDNA-Mutationen als auch zu einer erhöhten ROS-Produktion kommt.

Calcium ist ein wichtiger sekundärer Botenstoff in Organismen. Unter anderem bewirkt die Ausschüttung von Ca^{2+} -Ionen aus dem ER eine Erhöhung der Metabolismusrate. So stimuliert Calcium im Cytosol und im Mitochondrium die Zellatmung auf unterschiedlichen Ebenen. Eine Überladung der Mitochondrien mit Ca^{2+} -Ionen löst hingegen Apoptose aus. Entsprechend ist eine Regulierung der cytosolischen und mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle ebenfalls von großer Bedeutung.

In dieser Arbeit wurde der C57BL/6NTac-Inzuchtstamm verwendet. Vergleichend wurde der konplastische Mausstamm C57BL/6NTac-mt^{NODL^{tl}} untersucht. Dieser unterscheidet sich vom Hintergrundstamm durch eine Punktmutation im Gen der mitochondrial kodierten Untereinheit 3 der Cytochrom-c-Oxidase (COX3).

Es war Ziel dieser Studie:

1. die altersabhängige ROS-Produktion in Leber, Gehirn und Muskel im C57BL/6NTac-Tiermodell zu bestimmen.
2. Auswirkungen einer mtDNA-Mutation im konplastischen C57BL/6NTac-mt^{NODL_U}-Mausstamm auf die altersabhängige ROS-Produktion zu analysieren.
3. Mechanismen der oxidativen Verteidigung in der Leber auf verschiedenen Ebenen in beiden Stämmen im Altersverlauf zu beschreiben.
4. Struktur und Funktion der Mitochondrien in beiden Stämmen altersabhängig zu charakterisieren.
5. die altersabhängige Calciumhomöostase der Leber in beiden Stämmen zu analysieren.

2 Methoden

2.1 Versuchstiere

Die verwendeten Versuchstiere wurden in der zentralen Versuchstierhaltung der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock gezüchtet und gehalten. Sie wurden, gemäß den Empfehlungen der *Federation for Laboratory Animal Science Associations* (FELASA), regelmäßig auf murine Pathogene untersucht. Gehalten wurden die Tiere in Kohorten von bis zu vier Tieren pro Polycarbonat-Käfig Typ II (360 cm²). Sie hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Die Raumtemperatur betrug 20 ± 2 °C und die relative Luftfeuchtigkeit lag zwischen 50 ± 5 %. Die Tag-Nacht-Beleuchtung war auf einen 12-Stunden-Rhythmus eingestellt. Alle Tierversuche wurden vom Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei genehmigt (7221.3-1.1-061/10).

2.2 Analyse des ROS-Gehalts in Leber, Gehirn und Muskel

Mit dem Dihydroxyethidiumderivat „MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indikator“ (MitoSOX) kann der Gehalt an Superoxidanionen in Mitochondrien visualisiert werden. Dabei wird die Eigenschaft genutzt, dass MitoSOX selektiv in Mitochondrien gelangt und dort von Superoxidanionen zu 2-Hydroxyethidium oxidiert wird (Abbildung 10). Dieses Molekül ist rot fluoreszierend, wenn es an Nukleinsäuren bindet. Das Absorptionsmaximum liegt bei 510 nm und das Emissionsmaximum bei 580 nm.

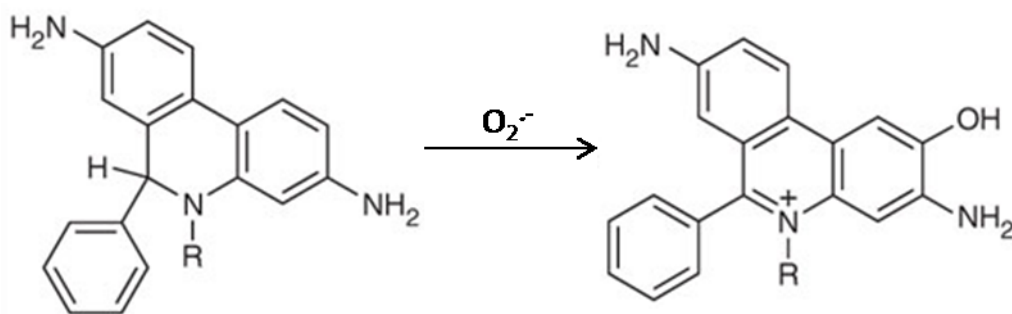


Abbildung 10: Oxidation von MitoSOX™ durch Superoxidanionen; $R = -(CH_2)_6P^+(Ph)_3$. Bei der Reaktion entsteht das rot fluoreszierende 2-Hydroxyethidium.

25 µg MitoSOX wurden in 6,5 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) auf ein Volumen von 100 µL eingestellt. Diese Lösung wurde je 3 Tieren beider Stämme im Alter von 3, 6, 9, 12, 18 und 24 Monaten intraperitoneal appliziert. Nach einer Stunde wurden die Tiere durch zervikale Dislokation abgetötet. Die

Organe Leber, Gehirn und Muskel wurden daraufhin entnommen und in Kryomatrix eingebettet tiefgefroren. Von den Organen wurden Gewebeschnitte mit einer Stärke von 5 µm mittels des Leica CM 1850 Kryostats hergestellt und auf Objektträger aufgezogen. Vor der Weiterverarbeitung inkubierten die Objektträger für 15 min bei Raumtemperatur in PBS. Dabei löste sich die gefrorene Kryomatrix von den Gewebeschnitten. Roti®-Mount FluorCare DAPI wurde als Eindeckmedium und zur Färbung der Zellkerne im Gewebe verwendet. Mit dem Fluoreszenzmikroskop Fluoview FV10i und einem 60x 1,35 UPCSAPÖl Immersionsobjektiv wurden pro Gewebeschnitt 5 Bilder unter Verwendung des 559 nm LD Lasers aufgenommen. Dabei wurde 2-Hydroxyethidium angeregt und emittierte Strahlung der Wellenlänge 578 nm detektiert. Die Bilder wurden mit dem Bildbearbeitungsprogramm AutoQuant X ausgewertet. Mit diesem konnte die Fluoreszenzintensität einzelner Bildpixel ermittelt werden. Diese konnte eine dimensionslose Größe von 0 bis 4095 annehmen. Um eine Hintergrundfluoreszenz auszuschließen, wurde per Definition ein Grenzwert mit einer Fluoreszenzintensität von 500 festgelegt. Um eine Aussage der relativen ROS-Produktion im Gewebe zu erhalten, wurde pro Bild der prozentuale Anteil der Pixel bestimmt, deren Fluoreszenzintensität höher als der festgelegte Grenzwert war.

2.3 Isolation von Hepatozyten

Die Tiere wurden mit 0,02–0,04 ml eines Ketamin/Rompun Gemisches im Verhältnis 3:1 narkotisiert. Daraufhin wurden 0,5 µl Heparin gespritzt, um die Blutgerinnung zu hemmen. Den narkotisierten Tieren wurde der Bauchraum geöffnet und die Pfortader wurde frei präpariert. Unterhalb der Pfortader wurde das Blut mit einer Pinzette gestoppt. Anschließend wurde an dieser ein paralleler Schnitt gesetzt. Am Schnitt wurde ein Katheter positioniert, durch welchen zu Beginn 50 ml an Puffer I (siehe Punkt 6.4.7) mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 30 ml/min gepumpt wurden. Nach 30 s wurde die Hohlvene angeschnitten, damit Puffer und Blut abfließen konnten. Nachdem Puffer I durchgelaufen war, wurden 50 ml Puffer II und anschließend 15–30 ml mit Collagenase (15 mg / 30 ml) versetzter Puffer III verwendet. Die Puffer sollten beim Durchlauf jeweils eine Temperatur von 37–40 °C aufweisen. Nachdem Puffer III durchgelaufen war, wurde die perfundierte Leber entnommen und in eine kalte sterile Petrischale gegeben. Nach Entfernung der Leberkapsel wurde die Leber in 25 ml Puffer IV geschwenkt, um die Hepatozyten zu lösen. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein mit Gaze überspanntes Becherglas überführt. Dabei passierten die Hepatozyten in der Suspension die Gaze, während z.B.

Bindegewebebestandteile herausgefiltert wurden. Die Hepatozyten wurden gewaschen, indem die Zellsuspension vier Mal in der Zentrifuge für 3 min bei 4 °C und bei 50 x g zentrifugiert wurde. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde jeweils der Überstand verworfen und das Pellet wieder in frischem Puffer IV aufgenommen. Anschließend wurde das Pellet in ca. 100 ml modifiziertem Williams E Medium (siehe Punkt 6.4.7) aufgenommen. Die Bestimmung von Zellzahl und Vitalität erfolgte unter einem Durchlichtmikroskop in der Bürker Zählkammer. Nun konnten die Hepatozyten für die Lebendexperimente in 35 mm Dishes mit einem kollagenbeschichteten Deckgläschenboden bzw. in 6-Wellplates in modifiziertem Williams E Medium ausgesät werden. Verbleibende Hepatozyten wurden abzentrifugiert. Das Pellet wurde nochmals geteilt, bei -70 °C gelagert und für die RNA-Isolation (2.4) und die Bestimmung der Cytochrom-c-Oxidase Aktivität (2.12) verwendet.

2.4 RNA-Isolation aus isolierten Hepatozyten

Die RNA-Isolation aus Hepatozyten erfolgte mit dem „RNeasy® Mini Kit“. Hepatozyten wurden dabei zuerst in 500 µl Lysepuffer (1 % Mercaptoethanol) resuspendiert und in „QIAshredder Mini Spin Columns“ im Vakuum-Homogenisator (2 min, 12000 U/min) homogenisiert. Um die RNA zu fällen, wurde die Suspension mit 500 µl Ethanol (70 %) versetzt. 700 µl der Suspension wurden auf Silicamembransäulen gegeben. Nach kurzer Zentrifugation (12000 U/min) verblieb die gefällte RNA auf der Silicamembran, während die gelösten Proteine verworfen wurden. Die RNA auf der Membran wurde anschließend zweimal per Zentrifugation (20 s, 12000 U/min) mit im Kit enthaltenem RW-Puffer gewaschen. Auf die Säule wurden dann für 20 min 10 µl DNase und 70 µl RDD-Puffer gegeben, um die DNA zu verdauen. Anschließend erfolgten wiederum Waschschrte mit RW-Puffer und mit Ethanol versetztem RPE-Puffer. Nach dem letzten Waschschrte wurde die RNA auf der Membran trocken zentrifugiert (2 min, 12000 U/min) und anschließend in 100 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (2 min, 12000 U/min) konnte die in Wasser gelöste RNA die Membran passieren und befand sich anschließend im Überstand. Der Überstand wurde dann in ein RNase-freies Eppendorf Gefäß überführt.

2.5 DNA-Isolierung aus Lebergewebe

Die Isolierung erfolgte mit dem „QIAamp DNA Mini-Kit“. Es wurde zu 15 mg Lebergewebe 180 µl ALT-Puffer und 20 µl Proteinkinase K gegeben und für 2 h bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurden 4 µl RNase A (100 mg/ml) dazu gegeben, für 2 min bei

Raumtemperatur inkubiert und dann 200 µl AL-Puffer zugefügt. Der Ansatz inkubierte für 10 min bei 70 °C. Zum Ausfällen der DNA wurden 200 µl Ethanol (96 %) dazugegeben. Die DNA wurde auf Silicamembransäulen gegeben und nacheinander in der Zentrifuge mit AW1- und AW2-Puffer (15 s, 8000 U/min) gewaschen. Abschließend wurde die DNA auf der Membran trocken zentrifugiert (3 min, 14000 U/min) und in AE-Puffer eluiert (1 min Inkubation, 1 min zentrifugieren bei 8000 U/min).

2.6 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration einzelner Proben erfolgte am Nanodrop 2000 Photometer[®]. 1 µl der Nukleinsäurelösung wurde auf die Messfläche des Photometers aufgetragen. Anschließend wurde ein Absorptionsspektrum von 220 nm bis 350 nm aufgenommen.

Nukleinsäuren haben ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Anhand des Absorptionskoeffizienten der entsprechenden Probe bei dieser Wellenlänge, konnte der Nukleinsäuregehalt der Probe ermittelt werden.

Proteine haben ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Über das Verhältnis der Absorptionskoeffizienten bei 260 nm und 280 nm konnte die Reinheit der Probe bezüglich Proteinkontaminationen bestimmt werden. Dabei sollte die 260/280 Ratio für RNA mindestens 2 und für DNA mindestens 1,8 ergeben, damit eine Proteinkontamination in der Probe ausgeschlossen werden konnte.

Bei 230 nm haben organische Komponenten ein Absorptionsmaximum. Um eine Verunreinigung der Nukleinsäurelösung mit organischen Substanzen auszuschließen wurde daher die 260/230 Ratio ermittelt. Diese sollte nicht deutlich unter 1,8 liegen.

Die Auswertung des Absorptionsspektrums der einzelnen Proben erfolgte mit der Software NanoDrop 2000/2000c.

2.7 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese aus den RNA-Proben erfolgte mit dem „Maxima™ first strand cDNA synthesis kit for RT-qPCR“. Dieser setzt sich aus einem Reaktions- und einen Enzym-Mix zusammen. Der Enzym-Mix beinhaltet Reverse Transkriptase und RNase-Inhibitoren. Das Enzym Reverse Transkriptase katalysiert die Umschreibung von RNA in cDNA. Der Reaktionsmix beinhaltet den Reaktionspuffer, dNTPs und Hexamer-Primer.

Zu 200 ng RNA wurden 4 µl des Reaktionsmix und 2 µl des Enzym-Mix gegeben. Anschließend wurde mit RNase-freiem Wasser ein Gesamtvolumen von 20 µl eingestellt. Die Synthese fand im Thermal Cycler statt und verlief nach folgendem Protokoll (Tabelle 1):

Tabelle 1: Programm zur cDNA Synthese im Thermal Cycler.

Zeit (min)	Temperatur (°C)
10	25
15	50
5	85

Im ersten Reaktionsschritt banden die Hexamer Primer an die RNA-Moleküle. Im zweiten Reaktionsschritt fand die eigentliche Reaktion statt. Durch die Enzymaktivität der Reverse Transkriptase entstanden RNA-DNA-Hybridmoleküle. Aufgrund der RNase H-Aktivität der Reverse Transkriptase wurde die RNA des Hybridmoleküls abgebaut. Somit konnten zu der entsprechenden RNA komplementäre DNA (cDNA) in Form von DNA-Doppelsträngen synthetisiert werden. Im dritten Schritt wurde die Reaktion durch eine Hitzeinaktivierung gestoppt.

2.8 Real-Time PCR

Durch die Real-Time PCR (RT-PCR) konnte cDNA in den Proben quantifiziert werden. In dieser Arbeit wurde das TaqMan-Prinzip angewendet. Dafür wurden TaqMan® Genexpression-Assays verwendet, welche für entsprechende Gensequenzen spezifische Primer und Sonden beinhalten.

Die sequenzspezifischen Sonden tragen ein Donor-Fluorochrom (Reporter) am 5'-Ende und ein Akzeptor-Fluorochrom (Quencher) am 3'-Ende. Wenn das Donor-Fluorochrom an der intakten Sonde angeregt wird, wird die gespeicherte Energie strahlungsfrei durch den Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) auf das Akzeptor-Fluorochrom übertragen und so die Donorfluoreszenz unterdrückt. Bei der RT-PCR bindet die spezifische Sonde an cDNA des zu untersuchenden Gens. Während der Elongationsphase der PCR wird die Sonde durch die Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase vom 5'-Ende her abgebaut, wodurch Donor- und Akzeptor-Fluorochrom räumlich voneinander getrennt werden. Dementsprechend findet kein FRET mehr statt und die Donorfluoreszenz kann detektiert werden. Folglich nimmt die Intensität der Donorfluoreszenz mit der Zeit während der RT-PCR zu. Als Maß für den Gehalt eines bestimmten Gens in Form der entsprechenden cDNA in den Proben wird der Ct-Wert

(cycle threshold) bestimmt. Dieser Wert entspricht dem Reaktionszyklus, in dem die gemessene Floreszenz über einem Schwellenwert liegt und sich deutlich vom Hintergrundsignal abhebt. Dementsprechend ist die Kopienanzahl der entsprechenden cDNA in der Probe umso höher, je niedriger der Ct-Wert ist. Bei dem verwendeten Reporter-Fluoreszenzfarbstoff handelte es sich jeweils um 6-FAM-Phosphoramidit (FAM).

Für die RT-PCR wurde ein Master Mix bestehend aus einem TaqMan® 2X Universal Master Mix, RNase freiem Wasser und der entsprechenden TaqMan® Genexpression-Assays im Verhältnis 5:6:1 angesetzt. Der TaqMan® 2X Universal Master Mix beinhaltet u.a. die Taq-Polymerase, dNTPs und den Reaktionspuffer. Je 11 µl des Master Mix wurden in Wells einer 96-Well-PCR-Platte gegeben. Dazu wurde je 1 µl der in Punkt 2.7 synthetisierten cDNA-Proben gegeben. Die Platte wurde mit einer Folie abgedeckt und die RT-PCR im 7900HT FAST Real-Time PCR System durchgeführt. Folgendes Programm wurde für die PCR eingestellt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Thermocycler-Protokoll für eine RT-PCR.

RT-PCR	Reaktionszeit (min)	Temperatur (°C)	40 Zyklen
Enzymaktivierung	2	50	
Taq Aktivierung	10	95	
Denaturierung	0,25	95	
Elongation	1	60	

Die Daten der Real-Time PCR wurden mit dem gerätespezifischen Programm SDS RQ-Manager ausgewertet. Die Ausgabe der Daten erfolgte in Form der Ct-Werte. Um die relative Genexpressionsrate eines bestimmten Gens einer Probe zu bestimmen, musste der ermittelte Ct-Wert zu dem Ct-Wert eines Haushaltsgens in der Probe in Relation gesetzt werden. Für nukleär kodierte Gene diente die Genexpressionsrate der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenz und für mitochondrial kodierte Gene diente die Genexpressionsrate der 16S-rRNA als Referenz. Die Messungen erfolgten jeweils im Doppelansatz.

Die relative Genexpression des Zielgens wurde folgendermaßen berechnet:

$$2^{Ct(\text{Haushaltsgen})} / 2^{Ct(\text{Zielgen})}$$

2.9 Bestimmung der mtDNA-Kopienanzahl

Für die Bestimmung der mtDNA-Kopienzahl wurde der „NovaQUANT Mouse Mitochondrial to Nuclear DNA Ratio Kit[®]“ verwendet. Dabei wird das Verhältnis von mitochondrialem Genom zu nukleärem Genom in einer Probe ermittelt. Hierfür werden die mitochondrialen Gene *trLEV* und *12S* und die nukleären Genen *BECN1* und *NEB* mittels RT-PCR quantifiziert. Für die Quantifizierung der PCR-Produkte wurde der DNA-Farbstoff SYBR Green verwendet. Dieser interkaliert unspezifisch in doppelsträngiger DNA, wodurch dessen Fluoreszenzintensität während der PCR exponentiell ansteigt. Umso häufiger das zu detektierende Gen in der Probe vorliegt, desto schneller steigt die Fluoreszenzintensität von SYBR Green während der RT-PCR an. Wie in Punkt 2.8 konnte so der Ct-Wert für das entsprechende Gen bestimmt werden.

Der Versuch zur Bestimmung der mtDNA-Kopienanzahl wurde zusammen mit Frau Dr. Cindy Johne durchgeführt. Je 24 Wells der 96-Well-Mikrotiterplatte des Kits waren mit einem Primerpaar des entsprechenden Gens (*trLEV*, *12S*, *BECN1*, *NEB*) versehen. Je 2 ng isolierter DNA der jeweiligen Probe (siehe 2.5) und 11,5 µl 2X RT² fast SYBR Green Mastermix[®] wurden in die Wells mit den verschiedenen Primerpaaren gegeben. Die RT-PCR wurde mit dem 7900HT Fast Real-Time System nach folgendem Protokoll durchgeführt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Thermocycler-Protokoll der RT-PCR zur Bestimmung der mtDNA-Kopienzahl.

RT-PCR	Reaktionszeit (min)	Temperatur (°C)	40 Zyklen
Taq Aktivierung	10	95	
Denaturierung	0,25	95	
Elongation	1	60	

Die mtDNA-Kopienzahl der Proben wurde folgendermaßen berechnet:

$$\Delta CtA = Ct(BCN1) - Ct(trLEV)$$

$$\Delta CtB = Ct(NEB) - Ct(12S)$$

$$mtDNA\text{-Kopienanzahl} = (2^{\Delta CtA} + 2^{\Delta CtB}) / 2$$

2.10 ATP- und ADP-Messung in Hepatozyten

Die ATP/ADP-Messung erfolgte mit dem „ATPlite-Kit“. Mit diesem Kit kann die ATP-Produktion in Zellen nach dem Prinzip der Biolumineszenz detektiert werden. Biolumineszenz bezeichnet die Emission von Licht, die durch chemische Reaktionen in lebenden Organismen hervorgerufen wird. Das Substrat des Kits, welches Luciferin und das

Enzym Luciferase beinhaltet, wird auf eine ATP-haltige Lösung gegeben. Dabei katalysiert die Luciferase die Reaktion von ATP, Luciferin und O_2 zu AMP, Oxyluciferin und CO_2 . Final entsteht Oxyluciferin im angeregten Zustand. Beim spontanen Übergang des angeregten Zustands in den Grundzustand wird Licht der Wellenlängen 560-562 nm emittiert. Die Intensität des emittierten Lichtes ist dabei proportional zur ATP-Ausgangskonzentration der untersuchten Lösung.

Es wurden 1×10^5 Hepatozyten in 2 ml modifiziertem Williams E Medium in 6-Well-Platten ausgesät. Die Kultivierung erfolgte für 72 h in einem Inkubationsschrank bei 37 °C und bei einer CO_2 -Atmosphäre von 5 %. Anschließend wurde das Medium von den Zellen abgezogen. Nach drei Waschschritten mit PBS wurden 200 µl Lysepuffer auf die Zellen gegeben und diese für 2 min auf einem Schüttler lysiert. 70 µl der entstandenen Suspension wurden zu 630 µl Puffer A gegeben. Jeweils 350 µl des Ansatzes wurden dann für die ATP- bzw. ADP-Messung verwendet.

Für die ATP-Messung wurden im Dreifachansatz 100 µl der jeweiligen Probe in ein Well einer 96 Well Mikroplatte gegeben und anschließend wurden jeweils 50 µl Substrat dazugegeben. Die Ansätze wurden für 2 min auf einem Schüttler im Dunklen homogenisiert. Bevor die Lumineszenzmessung gestartet wurde, adaptierten die Ansätze für weitere 8 min in einer lichtundurchlässigen Kammer. Die Lumineszenzmessung bei 562 nm erfolgte anschließend im Photometer (Victor³). Als Referenz wurde eine Eichgerade erstellt, auf der bekannte ATP-Konzentrationen gegen die entsprechende Lumineszenzintensitäten aufgetragen wurden.

Für die ADP-Messung wurden zur Suspension zusätzlich 19,5 µl Phosphoenolpyruvat (PEP, 30 mmol/l) und 0,5 µl des Enzyms Pyruvatkinase (PK, 2 units/µl) gegeben. Im Dreifachansatz wurden 105,7 µl der entsprechenden Probe in ein Well der Mikroplatte gegeben. Bevor 50 µl des Substrats zu den Ansätzen gegeben wurde, inkubierten diese für 15 min bei Raumtemperatur. Die Lumineszenzmessung erfolgte analog der ATP-Messung. Da die PK die Reaktion von PEP und ADP zu Pyruvat und ATP katalysierte, entsprach der gemessene Lumineszenzwert der summierten ATP- und ADP-Konzentration im ursprünglichen Ansatz.

2.11 Bestimmung des Proteingehalts von Hepatozyten

Für die Proteinbestimmung wurde das „QuantiProTM BCA Assay Kit“ verwendet. Das Prinzip dieses Kits basiert darauf, dass die Aminosäuren Tryptophan, Cystein und Tyrosin Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{1+} -Ionen reduzieren können. Bicinchoninsäure (BCA) wiederum reagiert mit

einwertigen Kupferionen zu einem Komplex mit violetter Farbe. Dieser Komplex besitzt ein Absorptionsmaximum bei 562 nm. Dabei ist die Höhe der Absorption proportional zur Proteinkonzentration in der entsprechenden Lösung.

Das „QuantiPro™ BCA Assay Kit“ beinhaltet die Lösungen A, B und C. Lösung A setzt sich aus dem entsprechenden Reaktionspuffer zusammen, in Lösung B ist BCA (4 % w/v) und in Lösung C ist Kupfer(II)-Sulfat (4 % w/v) gelöst.

Diese Komponenten wurden im Verhältnis 25:25:1 vermischt. Die Suspension der lysierten Zellen aus Punkt 2.10 wurde mit PBS 1:20 verdünnt. 100 µl dieser Verdünnung wurden im Dreifachansatz in Wells einer 96-Well-Mikroplatte gegeben und mit jeweils 100 µl der angesetzten BCA-Kupfer(II)-Sulfat-Lösung gemischt. Die Mikroplatte wurde kurz auf den Schüttler gestellt und inkubierte dann für 1 h bei 60 °C. Die Absorption wurde im Photometer (VICTOR³) bei 562 nm gemessen. Für die Berechnung wurde eine Eichgerade genutzt, die mit einer BSA-Verdünnungsreihe erstellt wurde.

2.12 Bestimmung der Cytochrom-c-Oxidase Aktivität in Hepatozyten

Für die Bestimmung der Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase (COX) wurde das „Complex IV Rodent Enzyme Activity Microplate Assay Kit“ verwendet. Dabei bindet COX an Antikörper, die am Boden von Mikroplatten verankert sind. Wird reduziertes Cytochrom *c* in die Wells gegeben, wird dies durch die in den Wells gebundene COX oxidiert. Reduziertes Cytochrom *c* absorbiert Licht einer Wellenlänge von 550 nm stärker als die oxidierte Form. Demnach kann die relative Aktivität der COX über den Abfall der optischen Dichte bei 550 nm pro Zeiteinheit ermittelt werden.

Zum Zellpellet (siehe 2.3) wurden 150 µl an Lösung 1 aus dem Kit gegeben. Das Zellpellet wurde resuspendiert und der Proteingehalt mit dem BCA-Assay (siehe 2.11) bestimmt. Mit Lösung 1 wurde daraufhin eine Proteinkonzentration von 5 mg/ml eingestellt. Zur Proteinlösung wurde Detergens im Verhältnis 9:1 gegeben, um die Proteine zu denaturieren und aus der Zellmembran zu lösen. Diese Lösung inkubierte für 30 min auf Eis und wurde anschließend zentrifugiert (20 min, 16000 U/min). Da sich im Überstand die gelösten Proteine befanden, wurde dieser abgezogen und das Pellet verworfen. Im Anschluss wurde mit Lösung 1 eine Proteinkonzentration von 50 µg / 200 µl eingestellt. Im Dreifachansatz wurden 200 µl der Probe in die Wells der Mikroplatte des Kits gegeben. Die Ansätze inkubierten für 3 h in den mit den Antikörpern beladenen Wells bei Raumtemperatur. Nach 3 h waren die Antikörper komplett mit COX besetzt. Die Wells wurden entleert und anschließend mit

Lösung 1 gewaschen. Auf Eis wurden dann 200 µl reduziertes Cytochrom *c* auf die Wells gegeben. Die OD wurde bei 550 nm im Photometer (Victor³) gemessen. Pro Well erfolgten 99 Messungen im Abstand von 94 s bei 30 °C. Die OD wurde für jeden Ansatz im Kurvendiagramm gegen die Zeit aufgetragen. Für jeden Ansatz wurde das Gefälle der Kurve im Bereich von 470 s bis 4135 s durch lineare Regression bestimmt. In diesem Bereich war eine lineare Abnahme der OD zu beobachten. Umso stärker das Gefälle der jeweiligen Kurve war, desto höher war die Aktivität der COX im Ansatz.

2.13 Cytosolische und mitochondriale Calciumhomöostase in Hepatozyten

Es wurde in einer parallelen Messung der zeitliche Verlauf der cytosolischen und mitochondrialen Calciumkonzentration nach verschiedenen Reizen in Hepatozyten analysiert. Dafür wurden isolierte Hepatozyten mit dem cytosolischen CMV-CAR-GECO1- und dem mitochondrialen CMV-GEM-GECO1-Vektor transfiziert. Diese Vektoren kodieren für fluoreszierende Fusionsproteine, deren Fluoreszenzintensität abhängig vom Calciumgehalt im umgebenden Milieu ist. Die exprimierten Fluoreszenzproteine bestehen aus dem entsprechenden Fluoreszenzprotein, Calmodulin und der Calmodulin bindenden Region der Myosin-leichte-Ketten-Kinase (M13) des Huhns. Dabei ist Calmodulin an den N-Terminus und M13 an den C-Terminus des Fluoreszenzproteins fusioniert. Bindet Calcium aus dem umgebenden Milieu an den Bindungsstellen des Calmodulins, kommt es zu Wechselwirkungen mit M13 und folglich zu einer Konformationsänderung des dazwischenliegenden Fluoreszenzproteins (Abbildung 11). Diese Konformationsänderung, führt zur Veränderung der Fluoreszenzintensität des Fusionsproteins.

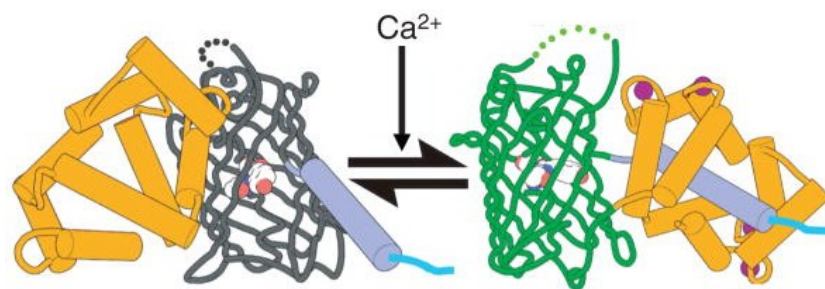


Abbildung 11: Prinzip der Konformationsänderung im Fusionsprotein nach Ca²⁺-Bindung. Die gelbe Struktur entspricht Calmodulin. Die blaue Struktur entspricht M13. Die dunkelgraue und die grüne Struktur entsprechen dem Fluoreszenzprotein in unterschiedlicher Konformation. Die dunkelvioletten Kugeln auf der Produktseite entsprechen dem an Calmodulin gebundenen Calcium. Adaption nach Y. Zhao [157].

Der CMV-GEM-GECO1-Vektor kodiert zusätzlich für eine mitochondriale Zielsequenz am Fusionsprotein. Dementsprechend gelangt dieses Fusionsprotein nach Expression direkt in die mitochondriale Matrix.

In Tabelle 4 sind die Absorptions- und Emissionsmaxima der entsprechenden Genprodukte CAR-GECO1 [158] und GEM-GECO1 [157] aufgelistet:

Tabelle 4: Absorptions- und Emissionsmaxima der Calciumabhängigen Fluoreszenzproteine.

Fluoreszenzprotein	Absorptionsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)
CAR-GECO1 + Ca ²⁺	560	609
CAR-GECO1 – Ca ²⁺	565	620
GEM-GECO1 + Ca ²⁺	390	455
GEM-GECO1 – Ca ²⁺	397	511

In diesem Versuch wurde ein excellence^R-Fluoreszenzmikroskopsystem verwendet. Dieses setzt sich aus dem inversen Forschungsmikroskop IX81, einem Xenon-Quecksilber Mischgasbrenner als Lichtquelle, entsprechenden Anregungs- und Sperrfiltern und einer CCD-Kamera zusammen. Das System ist mit einer Inkubationskammer ausgestattet, welche es ermöglicht, bei 37 °C, einer CO₂-Atmosphäre von 5 % und einer Luftfeuchtigkeit von 60 % zu arbeiten.

Das cytosolische CAR-GECO1-Fluoreszenzprotein wurde mit Licht einer Wellenlänge von 575 nm angeregt. Emittierte Strahlung wurde mit dem DAPI/FITC/TRITC Tripleband HC Filterset detektiert. Beim CAR-GECO1-Fluoreszenzprotein kommt es nur zu einer minimalen Verschiebung des Emissionsmaximums zwischen beiden Zuständen. Die Fluoreszenzintensität am Emissionsmaximum ist im mit Ca²⁺ gebundenen Zustand ca. 27 Mal höher als im ungebundenen Zustand [158]. Das mitochondriale GEM-GECO1-Fluoreszenzprotein wurde mit Licht einer Wellenlänge von 387 nm angeregt und emittierte Strahlung wurde mit dem Transmission Filterset F76-520 in einem Wellenlängenbereich von ca. 460 nm bis 555 nm detektiert. Es wurde postuliert, dass es bei diesem Fluoreszenzprotein zu einer deutlichen Verschiebung des Emissionsmaximums im Ca²⁺-beladenen Zustand kommt. Die Fluoreszenzintensität dieses Proteins sollte im detektierten Wellenlängenbereich im unbeladenen Zustand ca. zwei Mal höher als im mit Ca²⁺-beladenen Zustand [157]. Durch vergleichende Versuche mit dem sensitiveren mitochondrialen CAR-GECO1-Fusionsprotein wurde jedoch in dieser Studie festgestellt, dass auch das GEM-GECO1-Fusionsprotein im mit

Ca²⁺-beladenen Zustand bei den gegebenen Messbedingungen eine höhere Fluoreszenzintensität aufwies als im unbeladenen Zustand (siehe Punkt 6.2, Abbildung 41).

Für den Versuch wurden Hepatozyten von 3, 6, 9 und 12 Monate alten Tieren beider Stämme verwendet. Pro Alterszeitpunkt wurden Hepatozyten aus 3 männlichen Tieren isoliert. Pro Tier wurden 6 Ansätze mit je 150000 Hepatozyten in Dishes mit kollagenbeschichteten Deckgläschenboden ausgesät. Diese wuchsen für 24 h in modifiziertem Williams E Medium bei 37 °C und einer CO₂-Atmosphäre von 5 % an. Für die Transfektion wurden am nächsten Tag jeweils 1 µg CAR-GECO1- und GEM-GECO1-DNA und 6,4 µl des Transfektionsreagenz „PromoFectin-Hepatocyte“ zu 1 ml Williams E Medium auf die Zellen gegeben. In dieser Lösung inkubierten die Zellen für 24 h im Inkubationsschrank. Am folgenden Tag wurde das Transfektionsmedium von den Zellen abgezogen und diese mit PBS gewaschen. Danach wurde frisches Wachstumsmedium auf die Zellen gegeben.

An den beiden folgenden Tagen wurde die cytosolische und mitochondriale Calciumhomöostase analysiert. Dabei wurde zu Beginn das Wachstumsmedium von den Zellen des entsprechenden Dishes abgezogen und eine Krebs-Ringer-Lösung auf die Zellen gegeben. In dieser hungerten die Zellen für 1 h im Inkubationsschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Anschließend wurden am excellence^R-Fluoreszenzmikroskopsystem die cytosolische und die mitochondriale Calciumkonzentration nach Gabe von Glucose und Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP), einem natürlichen Entkoppler der Atmungskette, gemessen. Für die Aufnahmen der Zellen in der Inkubationskammer wurde ein UPLSAPO 60X Ölimmersionsobjektiv verwendet. Die Fluoreszenz wurde abwechselnd über 20 min alle 950 ms im mitochondrialen GEM-GECO- und im cytosolischen GAR-GECO-Kanal mit einer Belichtungszeit von jeweils 500 ms detektiert. Der Glukose- bzw. FCCP-Zusatz während der Aufnahmen erfolgte nach dem Schema in Abbildung 12.

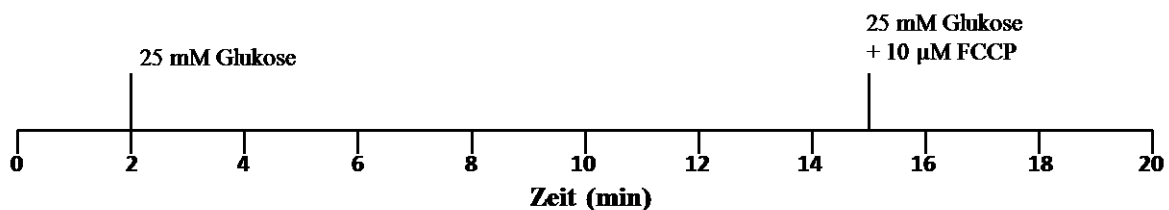


Abbildung 12: Zeitliches Schema der Glukose- und FCCP-Zugabe während der cytosolischen und mitochondrialen Calciummessung. Nach 2 min wurde jeweils eine Glukosekonzentration von 25 mmol/l eingestellt. Nach 15 min wurde zusätzlich eine FCCP-Konzentration von 10 µmol/l im Medium eingestellt.

Für die Auswertung des cytosolischen und mitochondrialen Calciumeinstroms nach Glukosegabe wurde die Fläche unter der Kurve („Area under the curve“; AUC) im Bereich von 2–5 min zur Baseline der Fluoreszenzintensität zum Ausgangszeitpunkt ermittelt. Zur Auswertung des zeitlichen Verlaufs der cytosolischen und mitochondrialen Calciumkonzentration nach FCCP Stimulus wurde jeweils die lineare Regression der Kurve von Sekunde 910 bis Sekunde 1020 ermittelt.

2.14 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials in Hepatozyten

Isolierte Hepatozyten wurden mit den Fluoreszenzfarbstoffen MitoTracker[®] Green (MTG) und Tetramethylrhodamin-Ethylester (TMRE) gefärbt. MTG färbt Mitochondrien von Zellen unabhängig vom MMP. Dabei diffundiert MTG passiv in die Mitochondrien der Zelle. Das Absorptionsmaximum dieses Fluoreszenzfarbstoffes liegt bei 490 nm und das Emissionsmaximum bei 516 nm. Die Färbung der Mitochondrien mit TMRE ist dagegen abhängig vom MMP. Ist das MMP hoch, so akkumuliert auch verhältnismäßig viel TMRE in den Mitochondrien. Ist das MMP gering, lagert sich entsprechend wenig TMRE in den Mitochondrien an. Dementsprechend ist die Fluoreszenzintensität von TMRE in Mitochondrien mit hohem MMP höher als in Mitochondrien mit niedrigem MMP. Das Absorptionsmaximum dieses Fluoreszenzfarbstoffes liegt bei 549 nm und das Emissionsmaximum bei 574 nm.

Für die Färbung wurden 2×10^5 Zellen auf kollagenbeschichteten Dishes mit Deckgläschenboden in modifiziertem Williams E Medium ausgesät. Die Zellen wuchsen für 48 h bei 37 °C und bei einer CO₂-Atmosphäre von 5 % im Inkubationsschrank an. Danach wurde das Medium abgezogen und die Zellen mit PBS gewaschen. MTG wurde 1:10000 in PBS verdünnt, auf die Zellen gegeben und anschließend für 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nachdem die Zellen mit PBS gewaschen worden waren, wurden die Zellen unter den gleichen Bedingungen mit TMRE gefärbt. Anschließend hungerten die Zellen eine weitere Stunde in PBS. Fluoreszenzbilder von jeweils 10 Zellen in modifiziertem Williams E Medium wurden dann mit dem Fluoreszenzmikroskop Fluoview FV10i mit einem 60x 1,35 UPLSAPO Ölimmersionsobjektiv aufgenommen. Emittierte Strahlung des MTG mit einer Wellenlänge von 519 nm wurde unter Anregung mit dem 488 nm LD Laser detektiert. Unter Anregung mit dem 559 nm LD Laser wurde die emittierte Strahlung des TMRE mit einer Wellenlänge von 612 nm gemessen.

Um das relative MMP in den Mitochondrien der einzelnen Zellen zu bestimmen, wurde ein von der Wright Cell Imaging Facility entwickeltes Plug-in der Software ImageJ für

Kolokalisationsanalysen benutzt. Damit konnten für einzelne Zellen Kolokalisationsanalysen der beiden Fluoreszenzkanäle durchgeführt werden. Mit dieser Analyse konnte demnach bestimmt werden, wie stark das Fluoreszenzsignal der Mitochondrien in beiden Kanälen übereinstimmt. Umso größer die Übereinstimmung war, desto höher war auch das mittlere MMP in den Mitochondrien der Zellen.

2.15 Analyse der mitochondrialen Struktur in Hepatozyten

Es wurde die mittlere Zirkularität von Mitochondrien in Hepatozyten zu unterschiedlichen Alterszeitpunkten der untersuchten Stämme analysiert. Dafür wurden die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der MTG-gefärbten Hepatozyten aus Punkt 2.14 verwendet.

Für die Analyse wurden die ImageJ und die AutoQuant X Software genutzt. Mit der ImageJ Software wurden die Aufnahmen der Hepatozyten im Fluoreszenzanal dahingegen optimiert, dass die Grenzen einzelner fluoreszierender Mitochondrien zum Hintergrund hin verstärkt hervorgehoben wurden. Mit AutoQuant wurden die mit ImageJ bearbeiteten Aufnahmen analysiert. Die Software detektierte einzelne mitochondriale Strukturen in der Zelle und berechnete deren Zirkularität.

Strukturen, die eine Zirkularität von 1 aufweisen, entsprechen einem perfekten Kreis. Umso größer der Wert wird, desto mehr weicht die Struktur von einer kreisförmigen Struktur ab. Stark elongierte Mitochondrien weisen demnach einen höheren Zirkularitätswert auf als stark fragmentierte Mitochondrien. Umso höher der Wert der mittleren mitochondrialen Zirkularität in einer Zelle ist, desto größer ist auch der mittlere mitochondriale Elongationsgrad.

2.16 Quantifizierung mitochondrialer Loopstrukturen in Hepatozyten

Für die Quantifizierung mitochondrialer Loopstrukturen wurden die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der MTG-gefärbten Hepatozyten aus Punkt 2.14 verwendet.

Mit der Software FV10-ASW wurde die Fläche der Hepatozyten in der Aufnahme bestimmt. Anschließend wurde für jede Zelle die Anzahl an mitochondrialen Loop-Strukturen ausgezählt. Diese wurde dann zur Fläche des entsprechenden Hepatozyten in Relation gesetzt.

2.17 Analyse der Dynamik von Mitochondrien unterschiedlicher Struktur

Hepatozyten wurden mit dem pDendra2-Mito Vektor transfiziert [159]. Die Transfektion erfolgte wie in Punkt 2.13 beschrieben.

Das entsprechende Gen des Vektors kodiert für das photokonvertierbare Fluoreszenzprotein Dendra2, welches mit einer mitochondrialen Signalsequenz versehen ist. Bei Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 405 nm verschiebt sich das Absorptionsmaximum und das Emissionsmaximum des resultierenden Proteins vom grünen (490 nm | 507 nm) in den roten (553 nm | 573 nm) Wellenlängenbereich.

48 h nach der Transfektion wurden Zellen im unter Punkt 2.13 beschriebenen Fluoreszenzmikroskop mit einem 60x 1,35 UPLSAPO Ölimmersions Objektiv analysiert. Zur Photokonvertierung wurde eine 405 nm Laserdiode verwendet. Damit konnten selektiv einzelne Mitochondrien unterschiedlicher Struktur bestrahlt werden. Diese fluoreszierten nun im roten Wellenlängenbereich und waren gut von der grünen Fluoreszenz der anderen Mitochondrien zu unterscheiden. Daher war es möglich die Dynamik von einzelnen unterschiedlichen mitochondrialen Strukturen über einen bestimmten Zeitraum zu beobachten.

2.18 Analyse der mitochondrialen Netzwerkstruktur in Lebergewebe

Für die Analyse des mitochondrialen Netzwerks wurden Gewebeschnitte der Leber mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker[®] Deep Red (MTDR) angefärbt. Das Absorptionsmaximum dieses Farbstoffes liegt bei 644 nm und das Emissionsmaximum bei 665 nm.

Es wurden im Kryostat Gefrierschnitte der Leber einer Stärke von 5 µm von 3, 6, 9, 12 und 18 Monate alten Tieren angefertigt. Zur Färbung der Schnitte wurde MTDR im Verhältnis 1:20000 in PBS verdünnt. Auf Objektträger inkubierten die Gewebeschnitten in der MTDR Lösung in einer lichtundurchlässigen Küvette (30 min, 37 °C). Danach wurden sie mit PBS gewaschen. Nachdem die Schnitte mit dem Eindeckmedium Vectashield behandelt worden waren, wurden sie mit Deckgläschen eingedeckt. Der im Eindeckmedium enthaltene Fluoreszenzfarbstoff DAPI färbte zusätzlich die Zellkerne im Gewebe an. Es wurden jeweils fünf Bilder eines Schnittes mit dem Fluoreszenzmikroskop Fluoview FV10i und einem 60x 1,35 UPLSAPO Ölimmersions Objektiv aufgenommen. MTDR wurde unter Verwendung eines 559 nm LD Lasers angeregt.

Bei einer homogenen Struktur des mitochondrialen Netzwerkes im Gewebe, ist auch die Fluoreszenzintensität von MTDR im Gewebe gleichmäßig verteilt. Ist die Homogenität des

mitochondrialen Netzwerks gestört, kommt es im Gewebe vermehrt zu Bereichen mit akkumulierten Mitochondrien. Aufgrund der erhöhten mitochondrialen Dichte in diesen Bereichen, ist dort auch die Fluoreszenzintensität erhöht. Um die Homogenität des mitochondrialen Netzwerks im Lebergewebe von unterschiedlich alten Tieren zu bestimmen, wurden die Aufnahmen mit dem Bildbearbeitungsprogramm AutoQuant X ausgewertet. Wie in Punkt 2.2 wurde ein Grenzwert der Fluoreszenzintensität für die einzelnen Pixel in der jeweiligen Aufnahme festgelegt. Der Grenzwert für diese Analyse wurde mit dem Intensitätswert 1000 definiert. In Bereichen, in denen dieser Wert überschritten wurde, war die Mitochondriendichte erhöht und die Homogenität des Netzwerks gestört. Mit dem Programm wurde der prozentuale Anteil an Pixeln bestimmt, bei denen der definierte Grenzwert überschritten wurde. Dadurch ließ sich die Homogenität der mitochondrialen Netzwerkstruktur in Lebergewebe von Mäusen unterschiedlichen Alters beider Stämme miteinander vergleichen.

2.19 Statistische Auswertung

Sowohl die Säulendiagramme, als auch die Kurvendiagramme wurden mit dem Programm GraphPad-Prism erstellt. Im Säulendiagramm sind die Mittelwerte der einzelnen Datengruppe mit dem entsprechenden Standardfehler des Mittelwerts aufgetragen (SEM). Beim statistischen Vergleich von zwei Datengruppen in einem Diagramm wurde der Student's t-Test durchgeführt. In Diagrammen mit mehr als zwei unabhängigen Datengruppen wurde zur statistischen Auswertung der One-Way-ANOVA mit anschließendem Bonferroni-Post-Test durchgeführt. Der Signifikanzwert (P-Wert) wurde innerhalb der Diagramme in den Stufen *, \$, # ($P < 0,05$), **, \$\$, ## ($P < 0,01$) und ***, \$\$\$, ### ($P < 0,001$) angegeben. Das Symbol „*“ entspricht signifikanten Unterschieden zwischen beiden Tierstämmen. Die Symbole „\$“ bzw. „#“ entsprechen altersabhängigen signifikanten Unterschieden im Kontrollstamm beziehungsweise dem mtNOD-Stamm. Mit dem GraphPad-Prism Programm erfolgte auch die Berechnung der AUC (Area under the curve) und der linearen Regression.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies in Leber, Gehirn und Muskel

In Leber-, Gehirn- und Muskelgewebe von C57BL/6NTac- (Kontrolle) und konplastischen C57BL/6NTac-mt^{NODL⁺}-Tieren (mtNOD) wurden die ROS-Level bestimmt. Es sollte analysiert werden, ob es in den Geweben beider Stämme zu einer altersabhängig veränderten ROS-Produktion kommt.

3.1.1 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies in der Leber

Die ROS-Produktion in der Leber war altersabhängig zum 9-Monats-Zeitpunkt in beiden Stämmen signifikant erhöht (Abbildung 13). In beiden Stämmen entsprach der Wert der ROS-Produktion im Alter von 9 Monaten dem Maximalwert aller untersuchten Alterszeitpunkte. Im fortlaufenden Alter verringerte sich die ROS-Produktion im Kontrollstamm. Dies war beim mtNOD-Stamm nicht zu beobachten. Die ROS-Produktion verblieb hier im höheren Alter konstant auf dem Niveau von 9 Monaten. Dementsprechend war der Wert der ROS-Produktion gepoolter 18 und 24 Monate alter Tiere im mtNOD-Stamm signifikant höher als im Kontrollstamm.

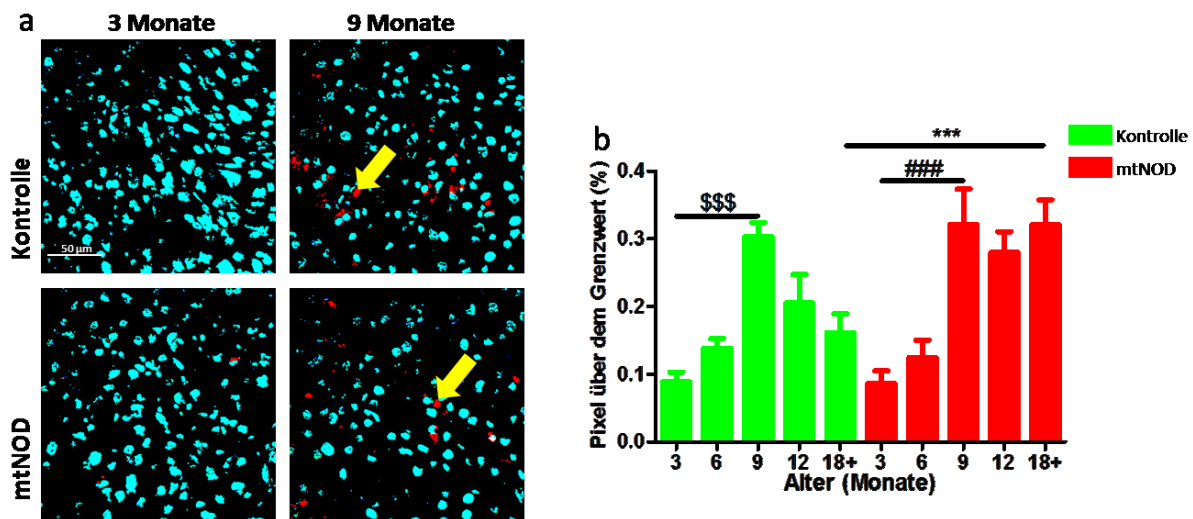


Abbildung 13: Reaktive Sauerstoffspezies in der Leber. Der ROS-Farbstoff MitoSox® wurde den Tieren injiziert. Nach einstündiger Inkubation wurde die Leber entnommen und Kryoschnitte angefertigt. Diese wurden mit einem DAPI-Farbstoff versetzt und an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. (a) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der ROS-Level in 3 und 9 Monate alten Kontroll- und mtNOD-Tieren (ROS: Rot, gelbe Pfeile; DAPI: blau). (b) Quantifizierung der altersabhängigen ROS-Produktion im Lebergewebe beider Stämme (n = 5 Bilder pro Tier; 3 Tiere pro Zeitpunkt; die Werte der 18 und 24 Monate alten Tiere wurden gepoolt und im Diagramm mit „18+“ gekennzeichnet).

3.1.2 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies im Gehirn

Die ROS-Produktion im Gehirn wies einen deutlichen altersbedingten Anstieg in beiden Tierstämmen auf (Abbildung 14).

Bei jungen 3 und 6 Monate alten Tieren des mtNOD-Stammes war die ROS-Produktion gegenüber Kontrolltieren im gleichen Alter tendenziell erhöht. Auffällig war eine signifikant erhöhte ROS-Produktion in 12 Monate alten mtNOD-Tieren. In diesem Alter erreichte die ROS-Produktion in diesem Stamm den Maximalwert. Ein signifikanter Anstieg des ROS-Levels war im Kontrollstamm erst nach dem 12-Monats-Zeitpunkt zu beobachten. So war der Wert der gepoolten 18 und 24 Monaten alten Tiere signifikant stark erhöht gegenüber jüngeren Tieren. Dieser Wert entsprach dem Niveau der 12 Monate alten mtNOD-Tiere.

Der Verlauf der altersabhängigen ROS-Produktion war zwischen den beiden Stämmen periodisch verschoben. So war ein Anstieg der ROS-Produktion im mtNOD-Stamm 3 Monate früher zu beobachten als im Kontrollstamm.

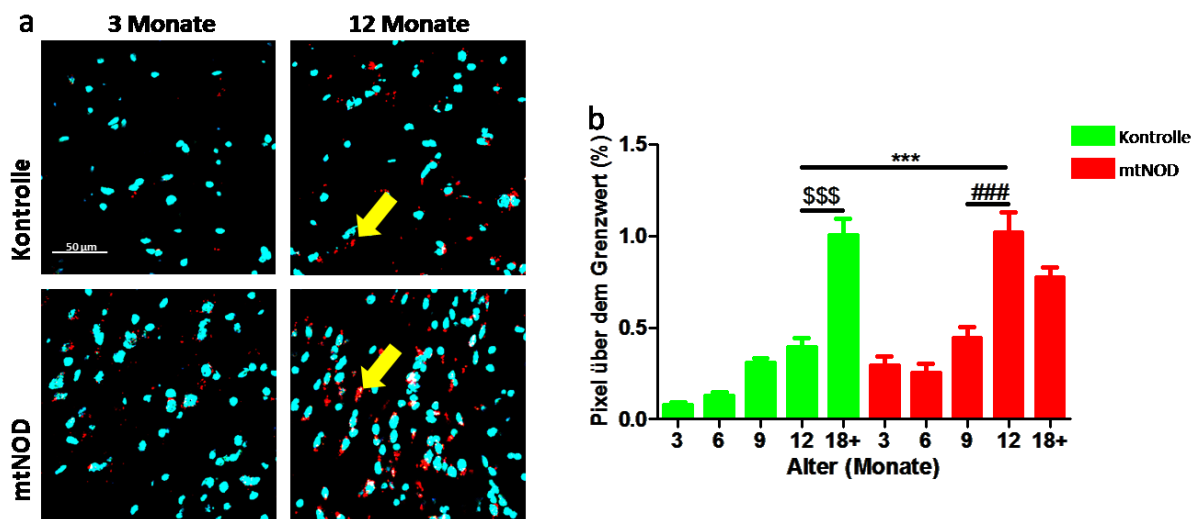


Abbildung 14: Reaktive Sauerstoffspezies im Gehirn. Der ROS-Farbstoff MitoSox® wurde den Tieren injiziert. Nach einstündiger Inkubation wurde das Gehirn entnommen und Kryoschnitte angefertigt. Diese wurden mit einem DAPI-Farbstoff versetzt und an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. (a) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der ROS-Level in 3 und 12 Monate alten Kontroll- und mtNOD-Tieren (ROS: Rot, gelbe Pfeile; DAPI: blau). (b) Quantifizierung der altersabhängigen ROS-Produktion im Lebergewebe beider Stämme (n = 5 Bilder pro Tier; 3 Tiere pro Zeitpunkt; die Werte der 18 und 24 Monate alten Tiere wurden gepoolt und im Diagramm mit „18+“ gekennzeichnet).

3.1.3 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies im Muskel

Auch im Muskel wies die ROS-Produktion einen altersabhängigen Anstieg in beiden Stämmen auf (Abbildung 15). Der ROS-Level der 3 bis 9 Monate alten mtNOD-Tiere war ähnlich dem Gehirn tendenziell erhöht gegenüber Kontrolltieren des gleichen Alters.

Im Alter von 12 Monaten kam es zu einem signifikanten Anstieg der ROS-Produktion im mtNOD-Stamm. Diese war allerdings in der Gruppe der 18 und 24 Monate alten Tiere wieder signifikant niedriger und gegenüber 9 Monate alten Tieren nur noch tendenziell erhöht.

Im Kontrollstamm war die ROS-Produktion der 12 Monate alten Tiere nur minimal höher als bei jüngeren Tieren. Ein signifikanter Anstieg war erst bei den 18 und 24 Monate alten Tieren zu beobachten. Dieser altersabhängige Maximalwert der ROS-Produktion in den Kontrolltieren war allerdings signifikant geringer als der Maximalwert in den mtNOD-Tiere im Alter von 12 Monaten.

Analog zu den Ergebnissen im Gehirn war das Muster der ROS-Produktion des Muskels im Kontrollstamm im Vergleich zum mtNOD-Stamm periodisch verschoben. So konnte ein signifikanter Anstieg der ROS-Produktion im Muskelgewebe von Tieren des mtNOD-Stammes 3 Monate früher detektiert werden.

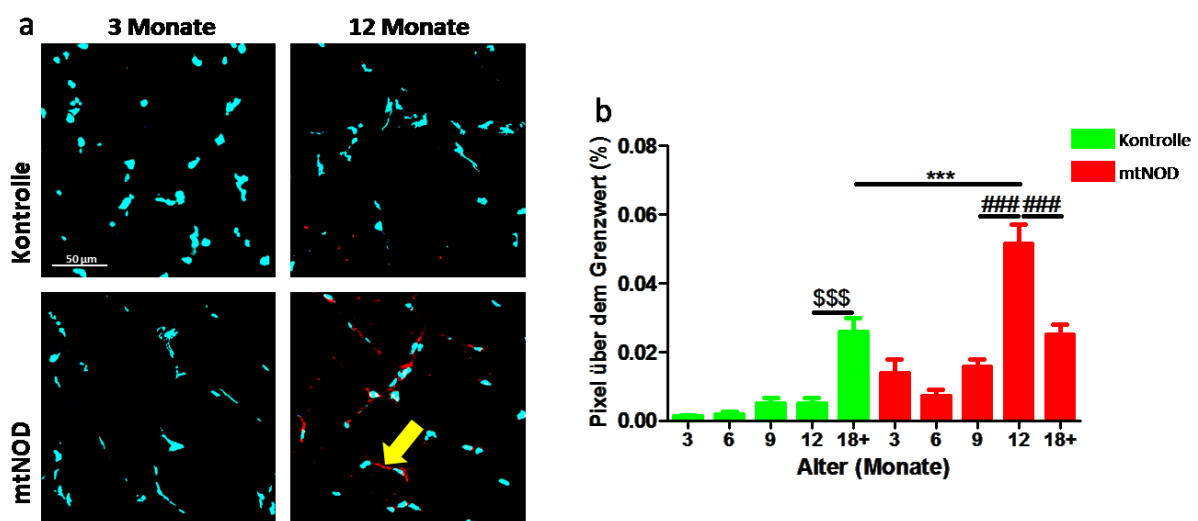


Abbildung 15: Reaktive Sauerstoffspezies im Muskel. Der ROS-Farbstoff MitoSox® wurde den Tieren injiziert. Nach einstündiger Inkubation wurde Muskelgewebe entnommen und Kryoschnitte angefertigt. Diese wurden mit einem DAPI-Farbstoff versetzt und an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. (a) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der ROS-Level in 3 und 9 Monate alten Kontroll- und mtNOD-Tieren (ROS: Rot, gelbe Pfeile; DAPI: blau). (b) Quantifizierung der altersabhängigen ROS-Produktion im Lebergewebe beider Stämme (n = 5 Bilder pro Tier; 3 Tiere pro Zeitpunkt; die Werte der 18 und 24 Monate alten Tiere wurden gepoolt und im Diagramm mit „18+“ gekennzeichnet).

3.1.4 Vergleich der ROS-Produktion der einzelnen Gewebe

Das MitoSOX Signal war im Gehirn (Abbildung 14) im Vergleich zur Leber und dem Muskel am höchsten. In den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des Gehirns im mtNOD-Stamm zum 12-Monats-Zeitpunkt war bei 1 % der Bildpixel eine erhöhte Fluoreszenzintensität festgestellt worden. Maximal hatten in Aufnahmen der Leber (Abbildung 13) nur 0,3 % der Pixel eine erhöhte Fluoreszenzintensität. Am geringsten war das MitoSOX Signal im Muskel (Abbildung 15). Zum Zeitpunkt der erhöhten ROS-Produktion in 18 und 24 Monate alten Kontroll- bzw. 12 Monate alten mtNOD-Tieren konnten nur 0,025 bzw. 0,05 % der Pixel mit einer erhöhten Fluoreszenzintensität detektiert werden.

Das Muster der altersbedingten ROS-Produktion in Gehirn und Muskel wies dieselbe Tendenz auf. In beiden Geweben war die ROS-Produktion in 12 Monate alten mtNOD-Tieren am höchsten. Im Vergleich dazu war bei beiden Geweben die ROS-Produktion innerhalb des Kontrollstammes in 18 und 24 Monate alten Tieren am höchsten. Entsprechend war das Muster der altersabhängigen ROS-Produktion in beiden Organen im mtNOD-Stamm im Vergleich zum Kontrollstamm um 3 Monate periodisch zum früheren Lebenszeitpunkt verschoben. Auch eine tendenziell erhöhtes ROS-Level in jungen (3 und 6 Monate) mtNOD-Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren des gleichen Alters war in beiden Geweben zu erkennen.

Im Vergleich zum Gehirn und dem Muskel wies die Leber ein anderes Muster der ROS-Produktion auf. Eine periodische Verschiebung der altersabhängigen ROS-Produktion der beiden Tierstämme war nicht zu beobachten. Außerdem wurde in der Leber ein Maximalwert der ROS-Produktion 3 bzw. 6 Monate früher detektiert als im Muskel und dem Gehirn.

3.2 Genexpression verschiedener COX-Untereinheiten in Hepatozyten

Da das Gen der mitochondrialen Untereinheit 3 der Cytochrom-c-Oxidase im mtNOD-Stamm im Vergleich zum Kontrollstamm eine Mutation trägt, sollte untersucht werden, ob altersabhängig Genexpressionsraten verschiedener COX-Untereinheiten davon beeinflusst werden. Neben der Genexpression von Untereinheit 3 wurde auch die mitochondrial kodierte Untereinheit 1 und die nukleär kodierten Untereinheiten 5a, 6a1 und 6b1 untersucht. Die Genexpressionsanalysen erfolgten an primär isolierten Hepatozyten.

3.2.1 Genexpression der Untereinheit 3

Die Untereinheit 3 der Cytochrom-c-Oxidase (COX3) nimmt eine zentrale Position in der dimeren Struktur der COX ein (Abbildung 16 b). Damit ist COX3 Bestandteil des katalytischen Kerns des Enzyms [160].

In 3 und 6 Monate alten Tieren war die Expressionsrate von *COX3* in beiden Stämmen auf ähnlichem Niveau (Abbildung 16 a). Im Alter von 9 Monaten konnte im Kontrollstamm ein signifikanter Abfall der Genexpression von *COX3* beobachtet werden. Im Vergleich zu 6 Monate alten Tieren nahm die Expression um 35 % ab. Im Alter von 12 Monaten stieg sie wieder tendenziell an, erreichte aber nicht den Wert der 3 und 6 Monate alten Tiere. Im mtNOD-Stamm war im Alter von 9 Monaten keine Abnahme der *COX3*-Genexpressionsrate zu beobachten. Entsprechend war sie in 9 und 12 Monate alten mtNOD-Tieren signifikant höher als in Kontrolltieren des gleichen Alters.

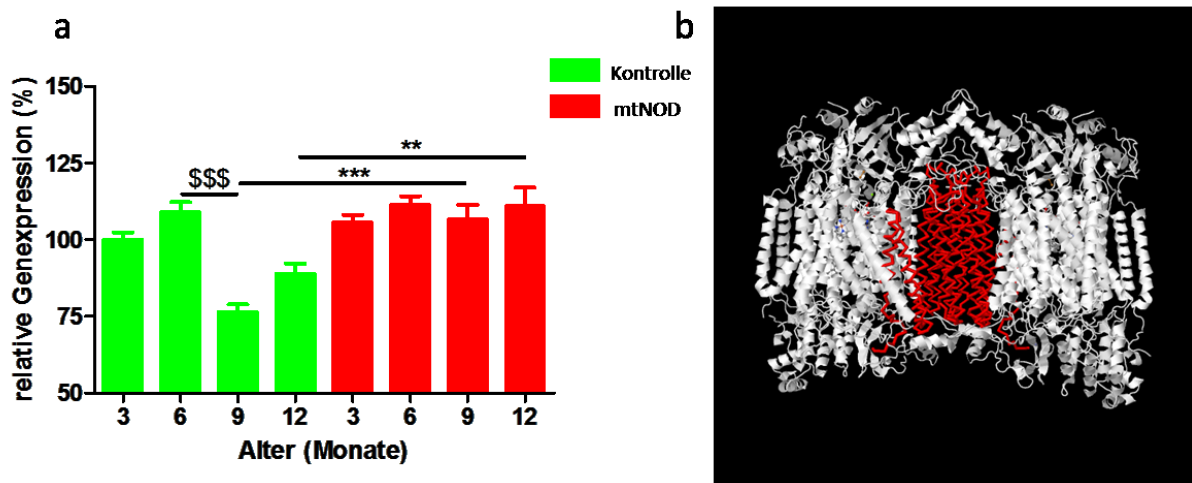


Abbildung 16: Altersabhängige *COX3*-Genexpressionsanalyse in Hepatozyten. (a) Quantifizierung der *COX3*-Genexpressionsrate im Kontroll- (grün) und im mtNOD-Stamm (rot). Die relative Genexpressionsanalyse wurde auf die mitochondrial kodierten 16S rRNA normalisiert. Per Definition wurde der Mittelwert 3 Monate alter Kontrolltiere auf eine Expressionsrate von 100 % festgelegt (n = 3 Tiere pro Alterszeitpunkt). (b) Bändermodell des COX Dimers des Rinderherzes. Die Untereinheit 3 ist rot hervorgehoben. Die Abbildung wurde mit der Software Jmol erstellt. Die entsprechenden Daten stammen von der RSCB Protein Datenbank [44].

3.2.2 Genexpression der Untereinheit 1

Die Untereinheit 1 der Cytochrom-c-Oxidase (COX1) befindet sich in der dimeren Struktur der COX distal der zentral gelegenen COX3 (Abbildung 17 b). Wie COX3 ist auch COX1 Bestandteil des katalytischen Kerns im Enzym [160].

In beiden Stämmen kam es im Alter von 6 Monaten zu einem signifikanten Anstieg der Genexpressionsrate von *COX1* um jeweils 40 % im Vergleich zu 3 Monate alten Tieren

(Abbildung 17 a). Die Genexpression des Gens in 3 und 6 Monate alten mtNOD-Tieren war jeweils tendenziell erhöht im Vergleich zu Kontrolltieren des gleichen Alters.

Im Alter von 9 Monaten war im Kontrollstamm eine signifikante Abnahme der *COX1*-Genexpressionsrate von 60 % zu beobachten. In 9 Monate alten mtNOD-Tieren kam es lediglich zu einer geringfügigen Abnahme. Dementsprechend war die Genexpressionsrate 9 Monate alter mtNOD-Tiere gegenüber 9 Monate alter Kontrolltiere signifikant um 55 % erhöht.

In 12 Monate alten Kontrolltieren war die Genexpressionsrate von *COX1* wieder um 40 % erhöht. In 12 Monate alten mtNOD Tieren war sie im Vergleich zu 6 Monate alten Tieren um 40 % geringer und somit auf ähnlichem Niveau der 12 Monate alten Kontrolltiere.

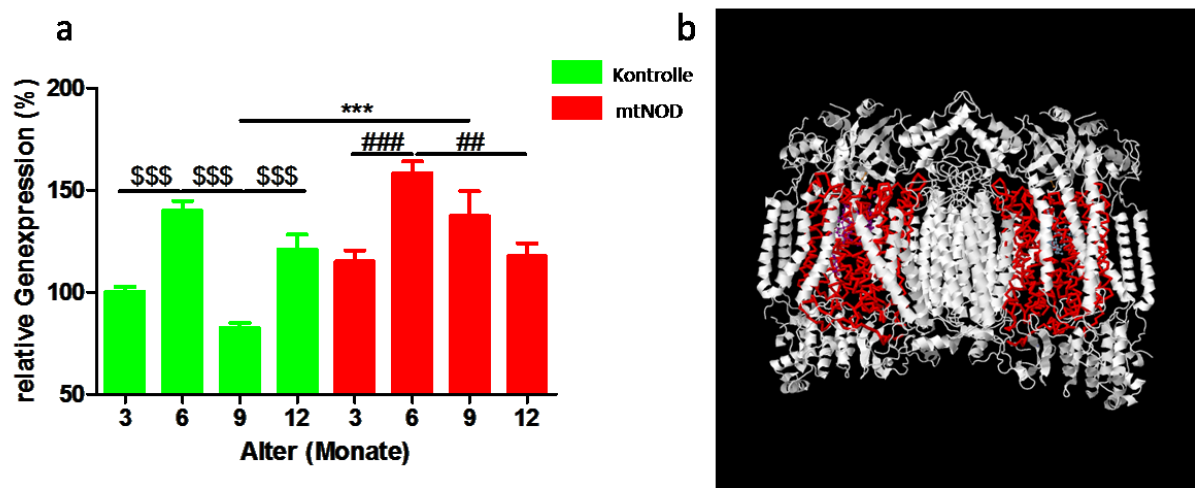


Abbildung 17: Altersabhängige *COX1*-Genexpressionsanalyse in Hepatozyten. (a) Quantifizierung der *COX1*-Genexpressionsrate im Kontroll- (grün) und im mtNOD-Stamm (rot). Die relative Genexpressionsanalyse wurde auf die mitochondrial kodierten 16S rRNA normalisiert. Per Definition wurde der Mittelwert 3 Monate alter Kontrolltiere auf eine Expressionsrate von 100 % festgelegt (n = 3 Tiere pro Alterszeitpunkt). (b) Bändermodell des COX Dimers aus dem Rinderherzen. Die Untereinheit 1 ist rot hervorgehoben. Die Abbildung wurde mit der Software Jmol erstellt. Die entsprechenden Daten stammen von der RSCB Protein Datenbank [44].

3.2.3 Genexpression der Untereinheit 5a

Die Untereinheit 5a der Cytochrom-c-Oxidase (COX5a) befindet sich in der dimeren Struktur der COX lateral an der Matrixseite der MIM (Abbildung 18 b). COX5a kann Schilddrüsenhormone binden. So wird die ATP-Bindungsstelle der Untereinheit 4 blockiert, wodurch eine ATP vermittelte Hemmung der COX behindert wird [161].

Das *COX5a*-Expressionsmuster war in beiden Stämmen ähnlich (Abbildung 18 a). Es kam jeweils zu einer kontinuierlichen Abnahme der Expressionsrate um 25 % im Altersverlauf von 3 zu 9 Monaten. Im Alter von 12 Monaten war die Expressionsrate des Gens wieder jeweils

um 20 % im Vergleich zu 9 Monate alten Tiere erhöht und somit vergleichbar mit dem 3-Monats-Zeitpunkt.

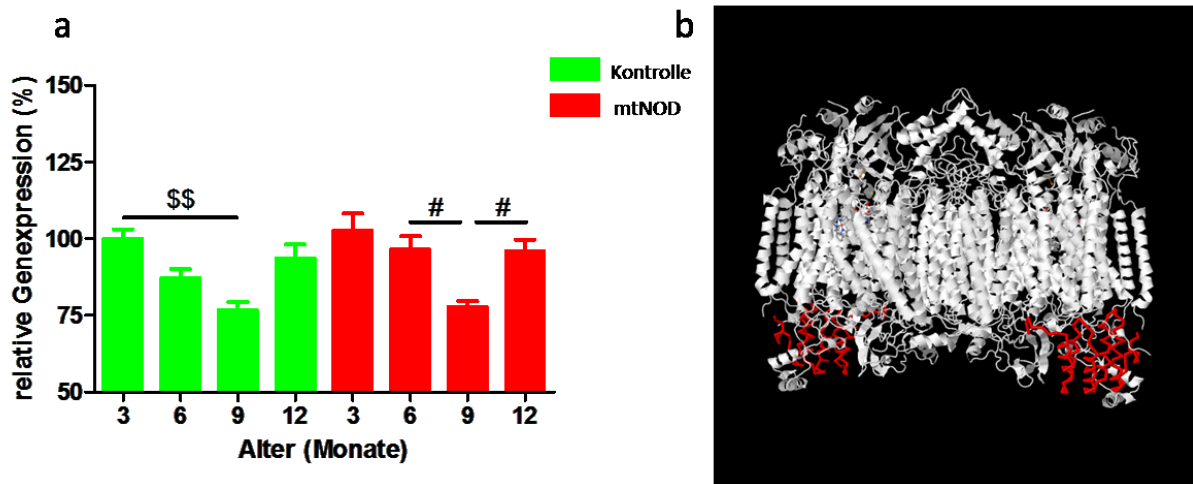


Abbildung 18: Altersabhängige *COX5a*-Genexpressionsanalyse in Hepatozyten. (a) Quantifizierung der Genexpressionsrate im Kontroll- (grün) und im mtNOD-Stamm (rot). Die relative Genexpressionsanalyse wurde auf GAPDH normalisiert. Per Definition wurde der Mittelwert 3 Monate alter Kontrolltiere auf eine Expressionsrate von 100 % festgelegt (n = 3 Tiere pro Alterszeitpunkt). (b) Bändermodell des COX Dimers aus dem Rinderherzen. Die Untereinheit 5a ist rot dargestellt. Die Abbildung wurde mit der Software Jmol erstellt. Die entsprechenden Daten stammen von der RSCB Protein Datenbank [44].

3.2.4 Genexpression der Untereinheit 6a1

Die Untereinheit 6a1 (*COX6a1*) ist in der dimeren Struktur der COX zentral am katalytischen Kern lokalisiert (Abbildung 19 a). Sie befindet sich in direkter Umgebung zu den Untereinheiten COX1 und COX3. *COX6a1* stabilisiert die dimere Struktur der COX, indem sie die beiden Monomere miteinander verbindet [44].

Die Genexpressionsrate von *COX6a1* war in 3, 6 und 9 Monate alten mtNOD-Tieren konstant. In 12 Monate alten mtNOD-Tieren war sie signifikant um 20 % gegenüber 3 Monate alten Tieren erhöht (Abbildung 19 b).

Verglichen mit der *COX6a1*-Expressionsrate 3 und 6 Monate alter mtNOD-Tiere war diese in Kontrolltieren des gleichen Alters unverändert. In 9 und 12 Monate alten Kontrolltieren war eine signifikante Abnahme der Genexpressionsrate von 25 % im Vergleich zu 6 Monate alten Tieren zu beobachten.

In Hepatozyten des Kontrollstammes von 9 und 12 Monate alten Kontrolltieren war die Expressionsrate im Vergleich zu den mtNOD-Tieren signifikant um 20 % (9 Monate) und 30 % (12 Monate) geringer.

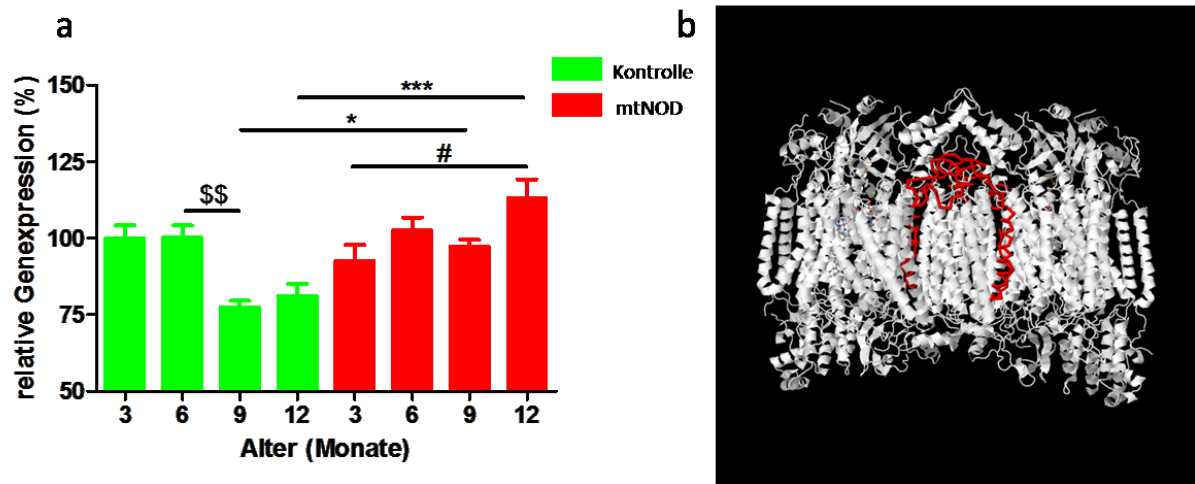


Abbildung 19: Altersabhängige *COX6a1*-Genexpressionsanalyse in Hepatozyten. (a) Quantifizierung der Genexpressionsrate im Kontroll- (grün) und im mtNOD-Stamm (rot). Die relative Genexpressionsanalyse wurde auf GAPDH normalisiert. Per Definition wurde der Mittelwert 3 Monate alter Kontrolltiere auf eine Expressionsrate von 100 % festgelegt (n = 3 Tiere pro Alterszeitpunkt). (b) Bändermodell des COX Dimers aus dem Rinderherzen. Die Untereinheit 6a1 ist rot dargestellt. Die Abbildung wurde mit der Software Jmol erstellt. Die entsprechenden Daten stammen von der RSCB Protein Datenbank [44].

3.2.5 Genexpression der Untereinheit 6b1

Die Untereinheit 6b1 (COX6b1) ist zentral an der Intermembranseite der MIM lokalisiert (Abbildung 20 b). Wie COX6a1 verbindet COX6b1 die beiden Monomere der COX und stabilisiert so die dimere Struktur [162]. Des Weiteren spielt COX6b1 eine wichtige Rolle bei der Bindung von Cytochrom *c* [44].

Das Genexpressionsmuster von *COX6b1* wies in beiden Stämmen einen altersabhängigen Anstieg von 3 zu 12 Monate alten Tieren auf. Allerdings war in beiden Stämmen die Genexpressionsrate der 9 Monate alten Tiere signifikant verringert (Abbildung 20 b).

Die *COX6b1*-Genexpressionsrate der 3, 6 und 12 Monate alten Kontrolltiere war jeweils signifikant um mehr als 20 % geringer als in mtNOD-Tieren des entsprechenden Alters. Allerdings war die Abnahme der Genexpression der 9 Monate alten Kontrolltiere im Vergleich zu 6 Monate alten Tiere mit 10 % wesentlich geringer als im mtNOD-Stamm mit 40 %.

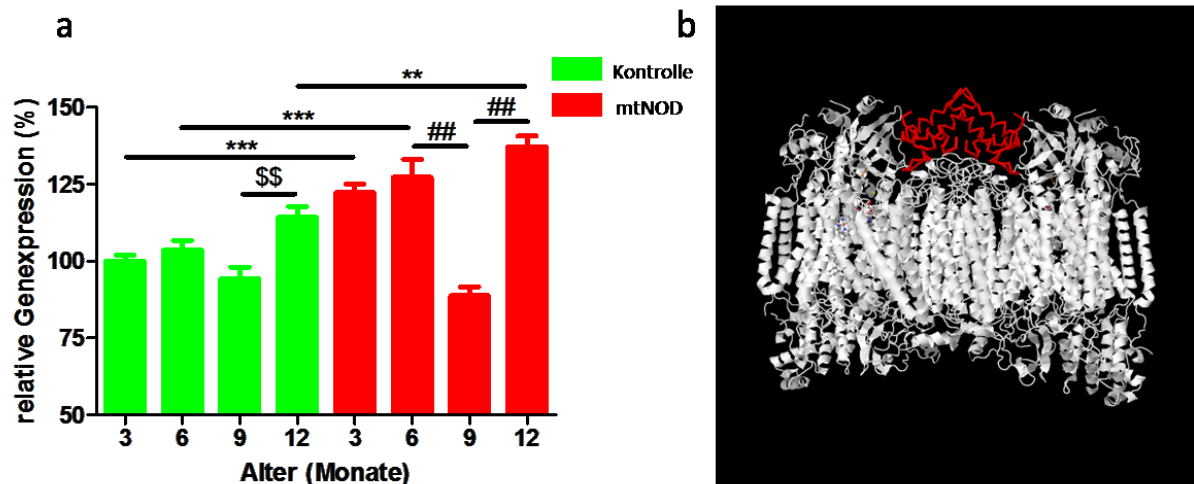


Abbildung 20: Altersabhängige *COX6b1*-Genexpressionsanalyse in Hepatozyten. (a) Quantifizierung der Genexpressionsraten im Kontroll- (grün) und im mtNOD-Stamm (rot). Die relative Genexpressionsanalyse wurde zu GAPDH normalisiert. Per Definition wurde der Mittelwert 3 Monate alter Kontrolltiere auf eine Expressionsrate von 100 % festgelegt (n = 3 Tiere pro Alterszeitpunkt). (b) Bändermodell des COX-Dimers des Rinderherzes. Die Untereinheit 6b1 ist rot dargestellt. Die Abbildung wurde mit der Software Jmol erstellt. Die entsprechenden Daten stammen von der RSCB Protein Datenbank [44].

3.2.6 Vergleich der Genexpressionsmuster einzelner COX-Untereinheiten

Die Genexpressionsraten der untersuchten COX-Untereinheiten in 3 und 6 Monate alten mtNOD-Tiere war ähnlich (*COX3*, *COX5a*, *COX6a1*) oder erhöht (*COX1*, *COX6b1*) im Vergleich zu Kontrolltieren gleichen Alters.

Bei allen analysierten COX-Untereinheiten war eine Abnahme der Genexpression 9 Monate alter Kontrolltiere im Vergleich zu 6 Monate alten Tieren zu beobachten. In mtNOD-Tieren war eine signifikante Abnahme der Genexpression nur bei *COX5a* und *COX6b1* zu erkennen, nicht jedoch bei Untereinheiten, die Bestandteil des katalytischen Kerns sind bzw. an diesen angelagert sind (*COX1*, *COX3*, *COX6a1*).

Die Genexpressionsrate 12 Monate alter mtNOD-Tiere war im Vergleich zu Kontrolltieren des gleichen Alters vergleichbar (*COX1*, *COX5a*) oder signifikant deutlich erhöht (*COX3*, *COX6a1*, *COX6b1*).

3.3 Mitochondrialer Transkriptionsfaktor A und mtDNA-Kopienanzahl

Sowohl im Kontroll- als auch im mtNOD-Stamm kam es zu einem altersabhängigen Anstieg der mtDNA-Kopienanzahl in der Leber von 3 zu 12 Monate alten Tieren (Abbildung 21 a). Außerdem war jeweils eine transiente Abnahme der mtDNA-Kopienanzahl im Alter von 9 Monaten zu beobachten. Bei beiden Stämmen nahm die mtDNA-Kopienanzahl von 6 zu 9

Monate alten Tieren um 65 % ab. Im weiteren Alterungsverlauf nahm die mtDNA-Kopienanzahl in Kontrolltieren wieder tendenziell um 65 % und bei 12 Monate alten mtNOD-Tieren signifikant um 175 % zu. Damit war die mtDNA-Kopienanzahl in 12 Monate alten mtNOD-Tieren signifikant höher als in 12 Monate alten Kontrolltieren.

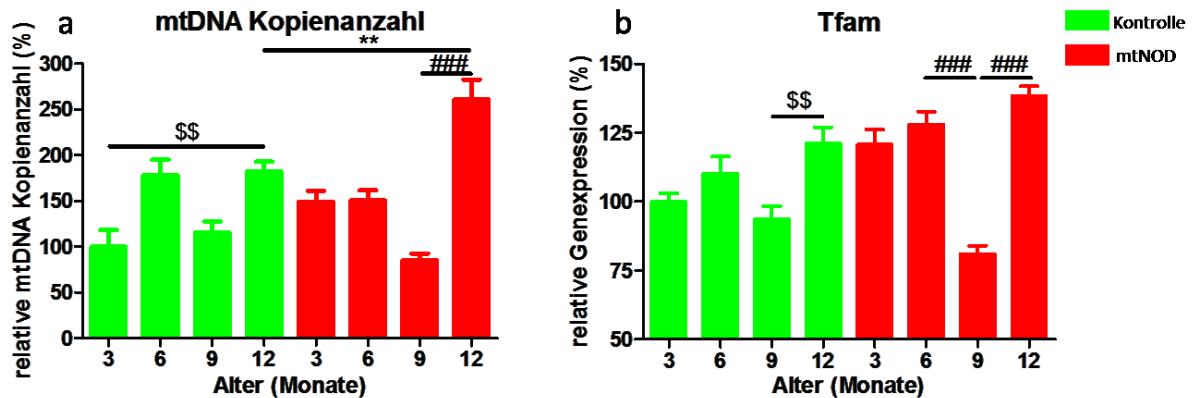


Abbildung 21: MtDNA-Kopienanzahl und relative *TFAM*-Genexpressionsrate in Hepatozyten. (a) Quantifizierung der altersabhängigen mtDNA-Kopienanzahl in Lebergewebe im Kontroll- (grün) und im mtNOD-Stamm (rot) (n = 4–8). (b) Quantifizierung der altersabhängigen *TFAM*-Genexpressionsrate in Hepatozyten im Kontroll- (grün) und im mtNOD-Stamm (rot). Die relative Genexpressionsanalyse wurde zu GAPDH normalisiert (n = 3). Per Definition wurde in beiden Diagrammen der Mittelwert 3 Monate alter Kontrolltiere auf eine mtDNA-Kopienanzahl bzw. Expressionsrate von 100 % festgelegt.

Der mitochondriale Transkriptionsfaktor A (TFAM) stimuliert u.a. die mitochondriale Transkription und aktiviert die mitochondriale Replikation [163, 164]. In beiden Stämmen kam es zu einem altersabhängigen Anstieg der *TFAM*-Genexpressionsrate von 3 zu 12 Monate alten Tieren (Abbildung 21 b). In 3, 6 und 12 Monate alten mtNOD-Tieren war sie jedoch jeweils um 20 % höher als in Kontrolltieren des entsprechenden Alters. Analog zum altersabhängigen Muster der mtDNA-Kopienanzahl war eine transiente Abnahme der *TFAM*-Genexpressionsrate zum 9-Monats-Zeitpunkt in beiden Stämmen zu beobachten. Sie war im Vergleich zum 6-Monats-Zeitpunkt im Kontrollstamm um 15 % und im mtNOD-Stamm um 45 % geringer.

Der Altersverlauf der mtDNA-Kopienanzahl und der *TFAM*-Genexpressionsrate wiesen ein sehr ähnliches Muster auf. Die Werte beider Parameter waren in 9 Monate alten Tieren erniedrigt, wohingegen sie jeweils in den 12 Monate alten mtNOD-Tieren signifikant erhöht waren im Vergleich zur gleichen Kontrolltiergruppe.

3.4 Genexpression antioxidativer Enzyme

Die Genexpressionsmuster der cytosolischen antioxidativen Enzyme SOD1, DJ1 und der Katalase (CAT) waren in beiden Stämmen vergleichbar (Abbildung 22 a, b, c). Es war jeweils ein signifikanter Anstieg der Genexpressionsrate dieser Enzyme in 12 Monate alten Tieren zu beobachten.

Die *SOD1*-Genexpressionsrate (Abbildung 22 a) war in 6 und 9 Monate alten Kontroll- und mtNOD-Tieren jeweils um 45 % im Vergleich zu 3 Monate alten Tieren verringert. In 12 Monate alten Tieren war die Genexpressionsrate wieder signifikant um 45 % im Kontroll- und um 25 % im mtNOD-Stamm erhöht.

Die *DJ1*-Genexpressionsrate (Abbildung 22 b) war in beiden Stämmen im Verlauf von 3 zu 9 Monaten um 15 % tendenziell verringert. In 12 Monate alten Tieren kam es in beiden Stämmen zu einem signifikanten Anstieg der Genexpression um 35 % gegenüber 9 Monate alten Tieren.

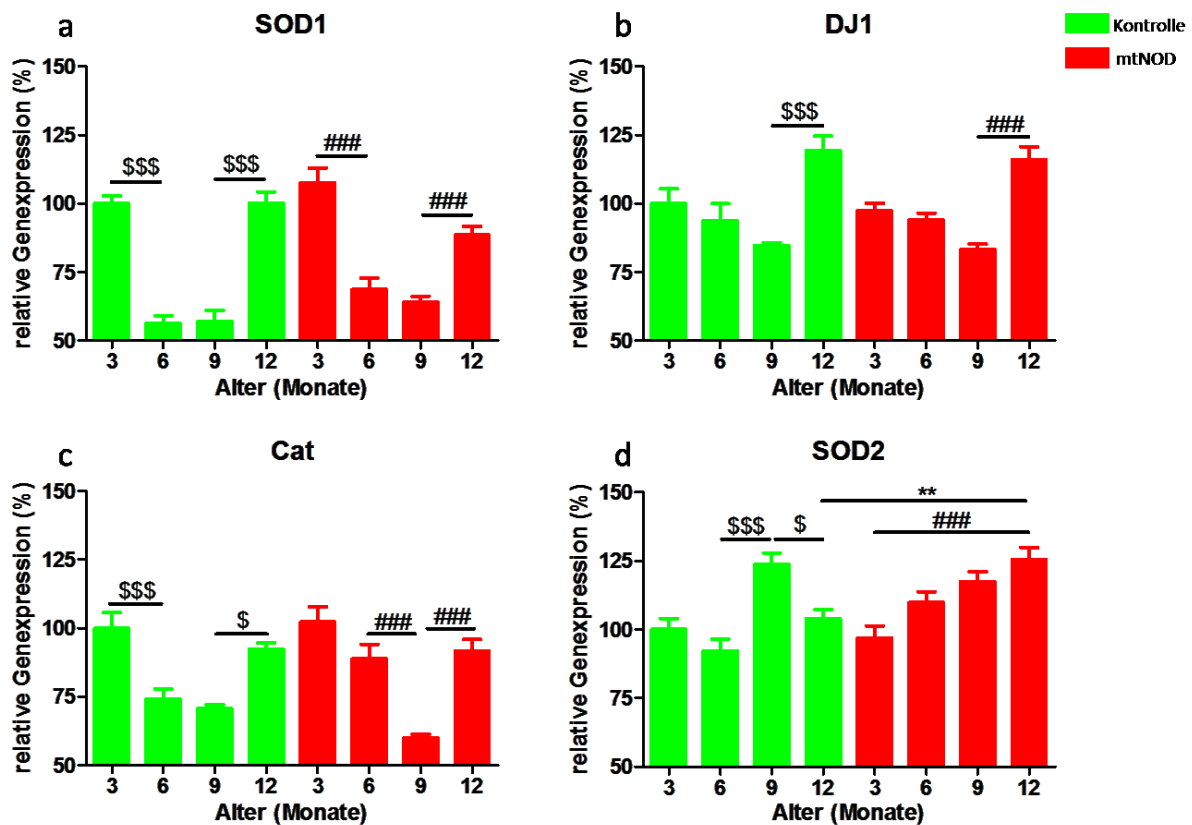


Abbildung 22: Altersabhängige Genexpressionsanalyse antioxidativer Enzyme in Hepatozyten. Quantifizierung der altersabhängigen Genexpression von *SOD1* (a), *DJ1* (b), *CAT* (c) und *SOD2* (d) im Kontroll- (grün) und im mtNOD-Stamms (rot). Die relative Genexpressionsanalyse wurde jeweils zu GAPDH normalisiert. Per Definition wurde der Mittelwert 3 Monate alter Kontrolltiere auf eine Expressionsrate von 100 % festgelegt (n = 3 Tiere pro Alterszeitpunkt).

Verglichen mit 3 Monate alten Tieren war die *CAT*-Genexpressionsrate (Abbildung 22 c) im Kontrollstamm in 6 Monate alten Tieren signifikant um 25 % und in 9 Monate alten Tieren signifikant um 30 % verringert. Im mtNOD-Stamm war die Genexpressionsrate in 9 Monate alten Tieren signifikant um 40 % verringert, während sie in 6 Monate alten mtNOD-Tieren nur tendenziell geringer war als in 3 Monate alten Tieren. In 12 Monate alten Tieren war die Genexpressionsrate wiederum um 20 % in Kontroll- und um 30 % in mtNOD-Tieren erhöht. Das Genexpressionsmuster der mitochondrialen *SOD2* unterschied sich von denen der cytosolischen antioxidativen Enzyme (Abbildung 22 d). Im mtNOD-Stamm stieg die *SOD2*-Genexpressionsrate im Altersverlauf von 3 zu 12 Monaten kontinuierlich um 25 % an. Dahingegen war im Kontrollstamm ein signifikanter Anstieg um 30 % in 9 Monate alten Tieren zu beobachten. Anschließend fiel die Expressionsrate in 12 Monate alten Kontrolltieren wieder um 20 % ab. Dementsprechend war die *SOD2*-Genexpressionsrate 12 Monate alter mtNOD-Tiere signifikant um 20 % höher als in Kontrolltieren des gleichen Alters.

3.5 Messungen zum Energiestoffwechsel

Um den altersabhängigen Energiestoffwechsel von Kontroll- und mtNOD-Tieren zu analysieren, wurde der ATP- bzw. ADP-Gehalt, das MMP und die COX-Aktivität in isolierten Hepatozyten analysiert. Außerdem wurden die altersabhängigen Expressionsmuster der Pyruvatcarboxylase (PCX) und des Uncoupling Protein 2 (UCP2) ermittelt.

3.5.1 Messung des ATP- und ADP-Gehalts in Hepatozyten

Der Wert der ATP/Protein-Ratio halbierte sich im Kontrollstamm von 3 zu 6 Monate alten Tieren und stieg bis zum 12-Monats-Zeitpunkt wieder tendenziell an (Abbildung 23 a). Die ATP/Protein-Ratio in 3 Monate alten mtNOD-Tieren war um 40 % geringer als bei Kontrolltieren des gleichen Alters. In 9 und 12 Monate alten mtNOD-Tieren war ein signifikanter Anstieg der Ratio zu beobachten. Sie war mit 10,5 bzw. 15 nmol/mg signifikant höher als in 9 und 12 Monate alten Kontrolltieren.

Der Wert der ADP/Protein-Ratio 3 Monate alter Kontrolltiere lag deutlich höher als in 6 und 12 Monate alten Tieren (Abbildung 23 b). In 9 Monate alten Kontrolltieren war dieser Wert transient erhöht. Die ADP/Protein-Ratio 3 Monate alter mtNOD-Tieren war signifikant niedriger als in 3 Monate alten Kontrolltieren. In 6 Monate alten Tieren verblieb dieser Wert auf konstant niedrigem Niveau, während er in 9 und 12 Monate alten mtNOD-Tieren signifikant erhöht gegenüber 3 und 6 Monate alten Tieren war. Entsprechend war die

ADP/Protein-Ratio auch in 12 Monate alten mtNOD Tieren im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrollen signifikant erhöht.

Das altersabhängige Muster des summierten ATP- und ADP-Gehalts in den Hepatozyten (Abbildung 23 c) war ähnlich dem Muster des ATP-Gehalts.

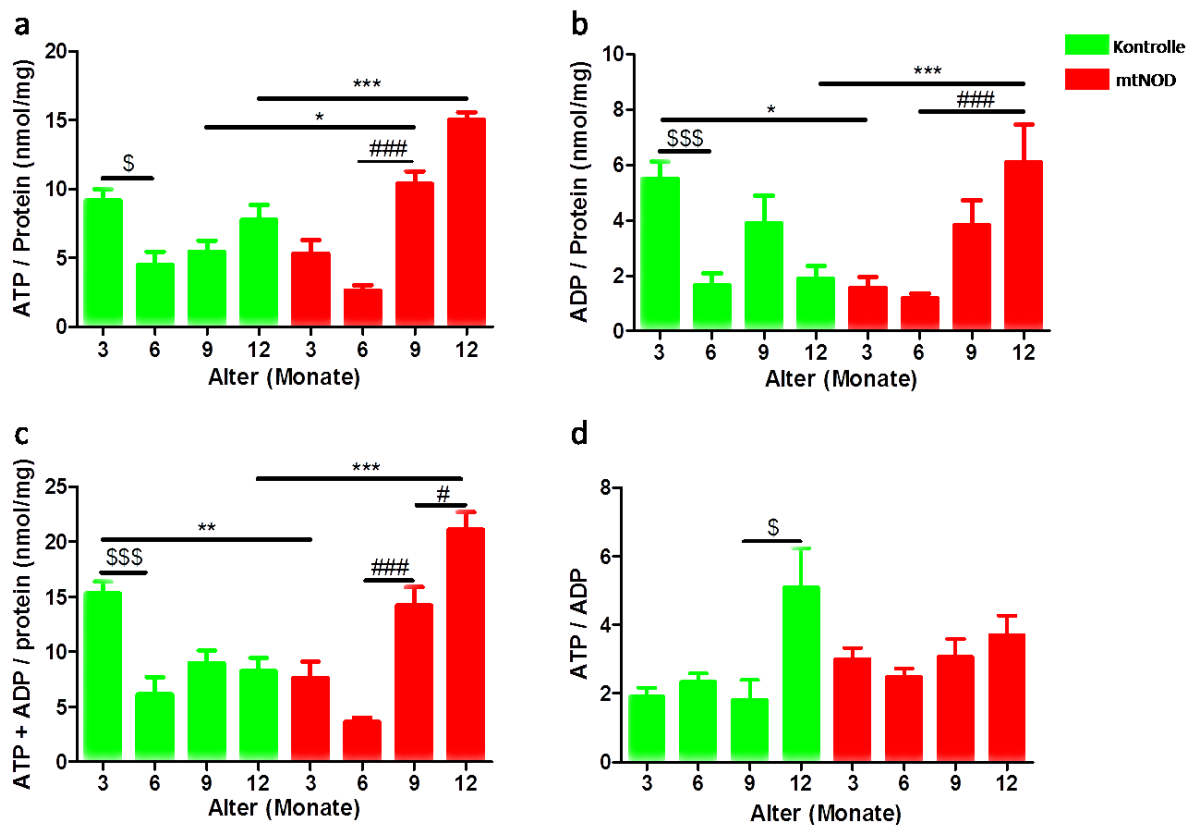


Abbildung 23: Messung des ATP- und ADP-Gehalts in Hepatozyten. Es sind die Säulendiagramme des Kontroll- (grüne Säulen) und des mtNOD-Stammes (rote Säulen) der altersabhängigen ATP/Protein-Ratio (a), ADP/Protein-Ratio, (ATP + ADP)/Protein-Ratio (c) und der ATP/ADP-Ratio (d) abgebildet (n = 3-4 Tiere pro Alterszeitpunkt).

Der altersabhängige Verlauf der ATP/ADP-Ratio 3 bis 9 Monate alter Kontrolltiere war unverändert. In diesen Tieren war der ATP-Gehalt in den Hepatozyten doppelt so hoch wie der ADP-Gehalt (Abbildung 23 d). Auch in den mtNOD-Tieren war die ATP/ADP-Ratio im Zeitraum von 3 bis 9 Monate konstant. Allerdings war der ATP-Gehalt der Hepatozyten in diesem Stamm 2,5 bis 3 Mal höher als der ADP-Gehalt. Im Kontrollstamm war eine signifikante Erhöhung der ATP/ADP-Ratio in Hepatozyten 12 Monate alter Tiere zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt war der ATP-Gehalt in den Hepatozyten 5 Mal höher als der ADP-Gehalt. In mtNOD-Mäusen war der ATP-Gehalt um den Faktor 3,7 höher als der ADP-Gehalt und signifikant geringer als im Kontrollstamm.

Zusammengefasst war die ATP-Konzentration in Hepatozyten junger Kontrolltieren höher als in jungen mtNOD-Tieren. Im Gegensatz dazu produzierten Hepatozyten von mtNOD Tieren im Alter signifikant mehr ATP als in Kontrolltieren. Des Weiteren war eine Erhöhung der ATP/ADP-Ratio in 12 Monate alten Kontrolltieren zu beobachten.

3.5.2 Mitochondriales Membranpotential in Hepatozyten

Im Kontrollstamm war eine signifikante Abnahme des MMP in Hepatozyten im Alter zu beobachten (Abbildung 24). Dahingegen konnte im mtNOD-Stamm eine signifikante Zunahme des MMP im Alter detektiert werden. Folglich war es in 3 und 6 Monate alten Kontrolltieren signifikant höher gegenüber mtNOD-Tieren des gleichen Alters. In Hepatozyten 9 und 12 Monate alter Tiere war der gegenteilige Effekt zu beobachten.

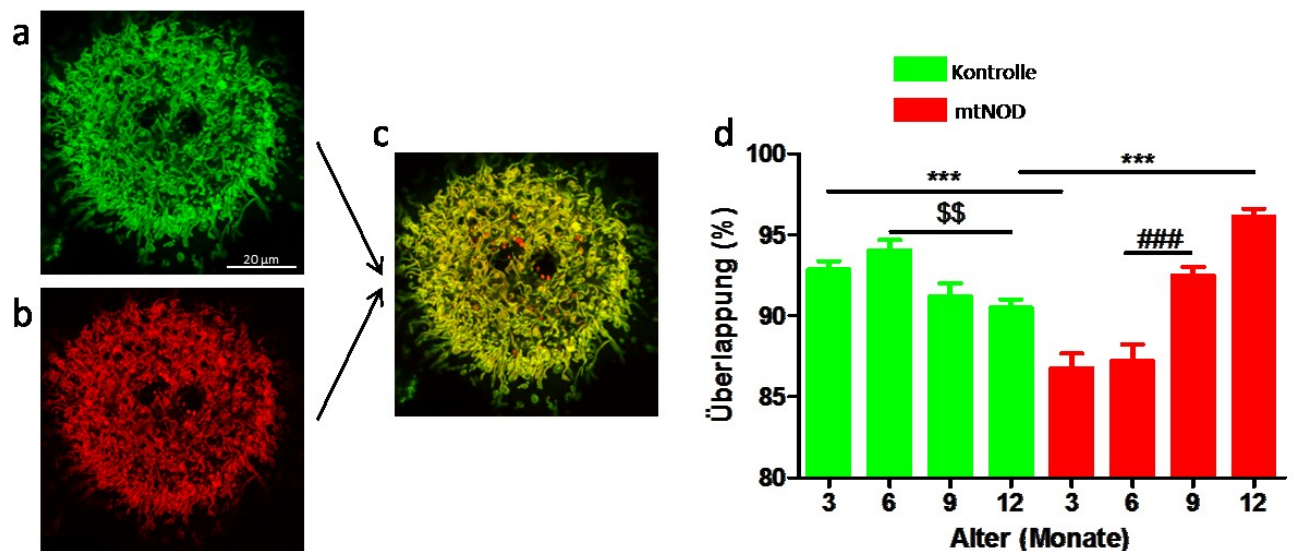


Abbildung 24: Mitochondriales Membranpotential in Hepatozyten. Aufnahme eines mit MTG (a) und TMRE (b) gefärbten Hepatozyten. Das MMP konnte über Kolokalisationsanalysen (c) bestimmt werden. (d) Quantifizierung des altersabhängigen relativen MMP in Hepatozyten. Grüne Balken entsprechen Kontrolltieren und rote Balken entsprechen mtNOD-Tieren. Ein Wert von 100 % würde einer vollständigen Überlappung beider Fluoreszenzkanäle bedeuten (n = 10 Bilder von 3-10 Tieren).

3.5.3 Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase in Hepatozyten

Die COX-Aktivität wurde über die Abnahme der optischen Dichte (OD) bei 550 nm von Cytochrom *c* pro Zeiteinheit ermittelt (Abbildung 25 a, b). Umso stärker das Kurvengefälle der OD war, desto effektiver konnte die COX Cytochrom *c* oxidieren. Im Bereich von 469-4134 s wurde das Kurvengefälle über lineare Regression ermittelt. In 3 Monate alten Kontrolltieren wurde ein steileres Kurvengefälle im Vergleich zu 12 Monate alten Tieren

ermittelt. Demnach konnte Cytochrom *c* in Hepatozyten 3 Monate alter Kontrolltiere schneller oxidiert werden als in Hepatozyten 12 Monate alter Kontrolltiere.

In Abbildung 25 c ist die mittlere COX-Aktivität beider Stämme zu den verschiedenen Alterszeitpunkten aufgetragen. Die COX-Aktivität in Hepatozyten der Kontrolltiere nahm im Altersverlauf von 3 zu 12 Monaten kontinuierlich signifikant ab. So war die COX-Aktivität in Hepatozyten 12 Monate alter Tiere um 20 % geringer als in Hepatozyten 3 Monate alter Tiere. Im Gegensatz dazu nahm die COX-Aktivität in Hepatozyten der mtNOD-Tiere im Alter signifikant zu. Sie war in 12 Monate alten Tieren um 20 % höher als in 3 Monate alten Tieren. Dementsprechend war bezüglich der COX-Aktivitätsrate ein gegenläufiger altersabhängiger Verlauf in den beiden Stämmen zu beobachten.

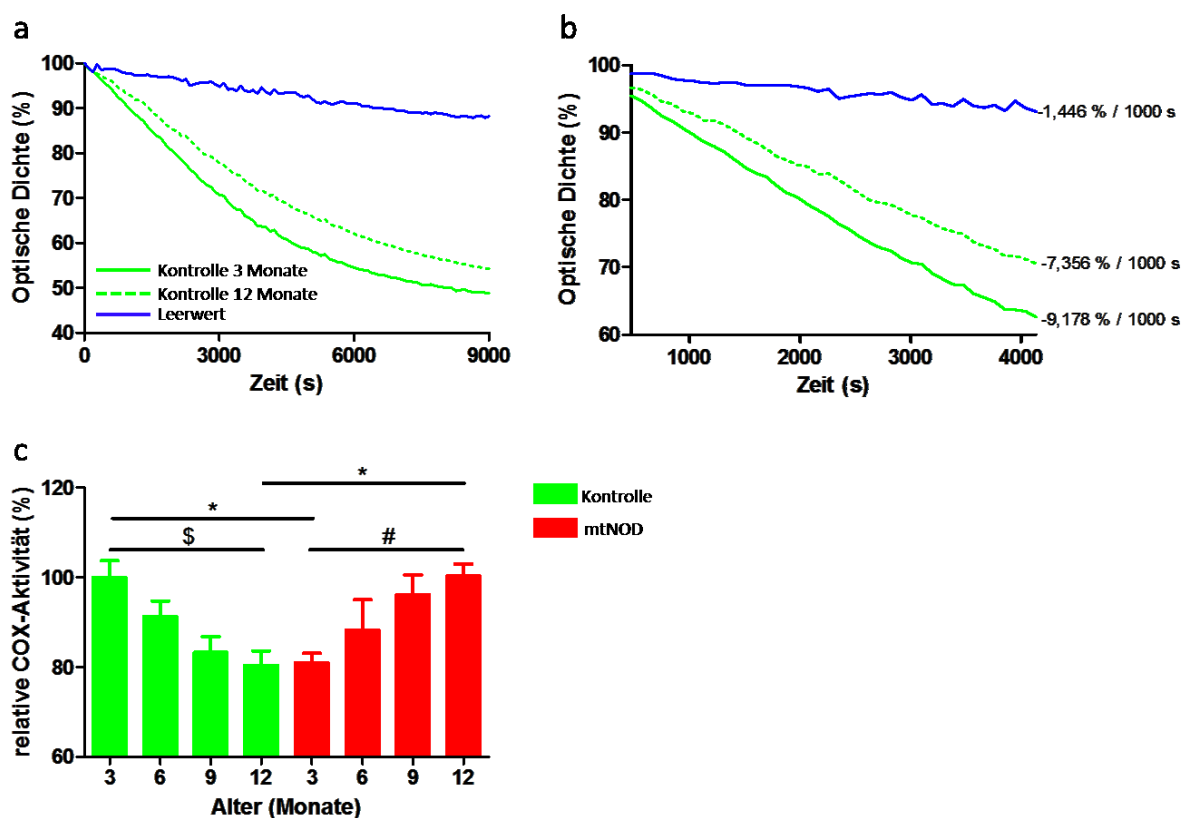


Abbildung 25: Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase in Hepatozyten. (a) Die Abnahme der optischen Dichte (OD) wurde gegen die Zeit aufgetragen. Gezeigt sind Beispielmessungen der 3 (grün) und 12 (grün gestrichelt) Monate alten Kontrolltiere. Des Weiteren wurde die Kurve der Leeransätze aufgetragen (blau). (b) Die gleichen Kurven sind im Bereich von 469 – 4134 s aufgetragen worden. In diesem Bereich wurde das Gefälle der entsprechenden Kurve durch lineare Regression bestimmt ($n =$ Je 3 Messungen von 3 Tieren; Leerwert $n = 8$). (c) Für die Auswertung wurden die Gefälle der Kurven der Einzelmessungen aus b positiviert. Per Definition wurde eine 100 %ige COX-Aktivität für 3 Monate alte Kontrolltiere festgelegt. Werte anderer Alterszeitpunkte wurden dazu in Relation gesetzt. Grüne Säulen im Diagramm entsprechen Kontroll- und rote Säulen mtNOD-Tieren ($n = 3$ Messungen von jeweils 3 Tieren).

3.5.4 Genexpression der Pyruvatcarboxylase und UCP2

Die Pyruvatcarboxylase (PCX) katalysiert die Reaktion von CO₂ und Pyruvat zu Oxalacetat. Dies ist u.a. eine anaplerotische Reaktion des Citratzyklus. Dementsprechend weist eine hohe *PCX*-Genexpressionsrate auf einen erhöhten Metabolismus im Citratzyklus hin.

Die *PCX*-Genexpressionsrate in Hepatozyten 9 und 12 Monate alter Kontrolltiere nahm signifikant um 30 % im Vergleich zu 3 Monate alten Tieren ab (Abbildung 26 a). Im mtNOD-Stamm war sie in Hepatozyten 6 Monate alter Tiere tendenziell um 10 % gegenüber Hepatozyten aus 3 und 9 Monate alten Tieren erhöht. Ein signifikanter Anstieg der Genexpression um 45 % war in 12 Monate alten mtNOD-Tieren im Vergleich zu 9 Monate alten Tieren zu beobachten. Die *PCX*-Genexpressionsrate in Hepatozyten 3 Monate alter Kontrolltiere war 30 % höher als in mtNOD-Tieren des gleichen Alters. Zum 12-Monats-Zeitpunkt war sie hingegen im mtNOD-Stamm signifikant um 50 % höher.

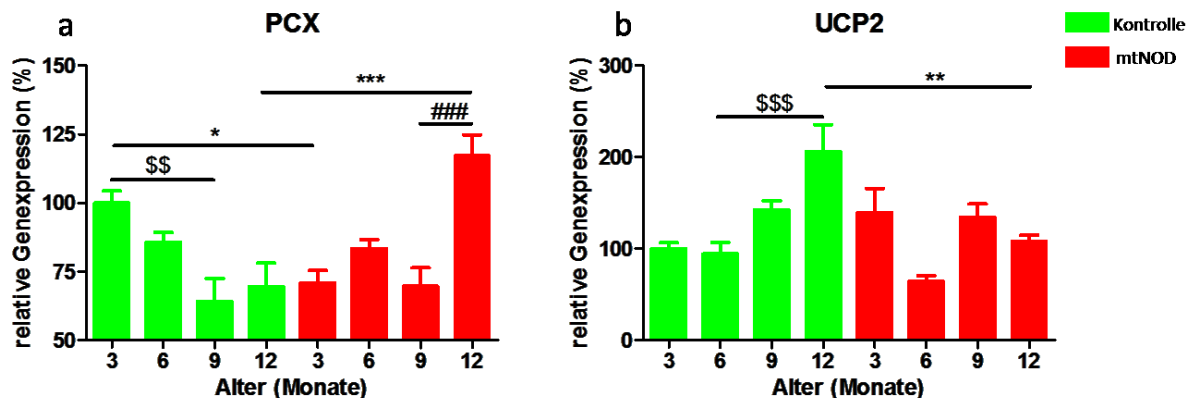


Abbildung 26: Genexpressionsanalyse metabolisch bedeutender Enzyme in Hepatozyten. Quantitative Analyse der altersabhängigen Genexpressionsraten von *PCX* (a) und *UCP2* (b) des Kontroll- (grün) und des mtNOD-Stammes (rot). Die relative Genexpressionsanalyse wurde jeweils zu GAPDH normalisiert. Per Definition wurde der Mittelwert 3 Monate alter Kontrolltiere auf eine Expressionsrate von 100 % festgelegt (n = 3 Tiere pro Alterszeitpunkt).

UCP2 ist ein bedeutender Entkoppler der mitochondrialen Atmungskette (siehe Punkt 1.4.2). Die Genexpression von *UCP2* in Hepatozyten 12 Monate alter Kontrolltiere hatte sich im Vergleich zu Hepatozyten von 3 und 6 Monate alten Tieren verdoppelt (Abbildung 26 b). Im Gegensatz dazu kam es im mtNOD-Stamm zu einer tendenziellen Abnahme der *UCP2*-Genexpression. Außerdem war eine transiente Abnahme der Genexpressionsrate in Hepatozyten 6 Monate alter mtNOD-Tiere um 70 % zu beobachten. Zum 12-Monats-Zeitpunkt war die *UCP2*-Genexpressionsrate in Hepatozyten 12 Monate alter Kontrolltiere im Vergleich zu mtNOD-Tieren des gleichen Alters signifikant um 100 % höher.

3.6 Mitochondriale Dynamik

Es wurde die Regulation der mitochondrialen Dynamik in Reaktion auf altersbedingten oxidativen Stress analysiert. Zur Bestimmung mitochondrialer Teilungs- und Fusionsprozesse in Hepatozyten unterschiedlichen Alters wurden Genexpressionsanalysen der mitochondrialen Fusionsproteine OPA1, MFN1 und MFN2 und der mitochondrialen Teilungsproteine DNMI1L, MFF und FIS1 durchgeführt. Des Weiteren wurde die morphologische Struktur von mit MTG gefärbten Mitochondrien untersucht und deren mittlerer Elongationsgrad in den Hepatozyten bestimmt.

3.6.1 Genexpression mitochondrialer Fusionsproteine

Die Genexpressionsraten von *MFN2* (Abbildung 27 b) und *OPA1* (Abbildung 27 c) in Hepatozyten von Kontrolltieren nahmen im Altersverlauf bis 9 Monate signifikant um 20 % (*MFN2*) und 35 % (*OPA1*) ab. Während die *MFN2*-Genexpressionsrate im Alter von 12 Monaten weiterhin niedrig war, wurde *OPA1* in 12 Monate alten Tieren wieder verstärkt exprimiert. Die *MFN1*-Genexpressionsrate in Hepatozyten 9 Monate alter Kontrolltiere war im Vergleich zu jüngeren Tieren nahezu unverändert (Abbildung 27 a). Erst im Alter von 12 Monaten war eine signifikante Abnahme um 40 % zu beobachten.

Die Genexpressionsmuster der einzelnen Fusionsproteine in Hepatozyten des mtNOD-Stammes waren ähnlich zueinander (Abbildung 27 a, b, c). Im Vergleich zu 3 Monate alten Tieren war die Genexpressionsrate der Fusionsproteine 12 Monate alter Tiere signifikant um 35 % (*OPA1*) 40 % (*MFN1*) und 45 % (*MFN2*) erhöht. Außerdem war jeweils ein transienter Maximalwert der Genexpression in 6 Monate alten Tieren zu beobachten. Die Expressionsraten erreichten zu diesem Zeitpunkt ungefähr den Wert 12 Monate alter Tiere.

Das oszillierende Muster der altersabhängigen Genexpressionsraten mitochondrialer Fusionsproteine im mtNOD-Stamm war auch zu beobachten, nachdem die Daten der 3 untersuchten Gene zusammengefasst worden waren (Abbildung 27 d). Im Kontrollstamm war eine signifikante Abnahme der zusammengefassten Genexpressionsraten mitochondrialer Teilungsproteine von 9 und 12 Monate alten Tieren im Vergleich zu 3 und 6 Monate alten Tieren um 20 % zu beobachten. Die Genexpressionsrate der zusammengefassten Fusionsproteine in Hepatozyten von 3 Monate alten Kontrolltieren war um 15 % höher als in mtNOD-Tieren. Dahingegen war sie in 6 und 12 Monaten alten mtNOD-Tieren signifikant um 20 % (6 Monate) und um 40 % (12 Monate) gegenüber den Kontrolltieren erhöht. Auch

im Alter von 9 Monaten war die Genexpression aller Fusionsproteine im mtNOD-Stamm um 15 % tendenziell erhöht verglichen mit den Kontrolltieren des gleichen Alters.

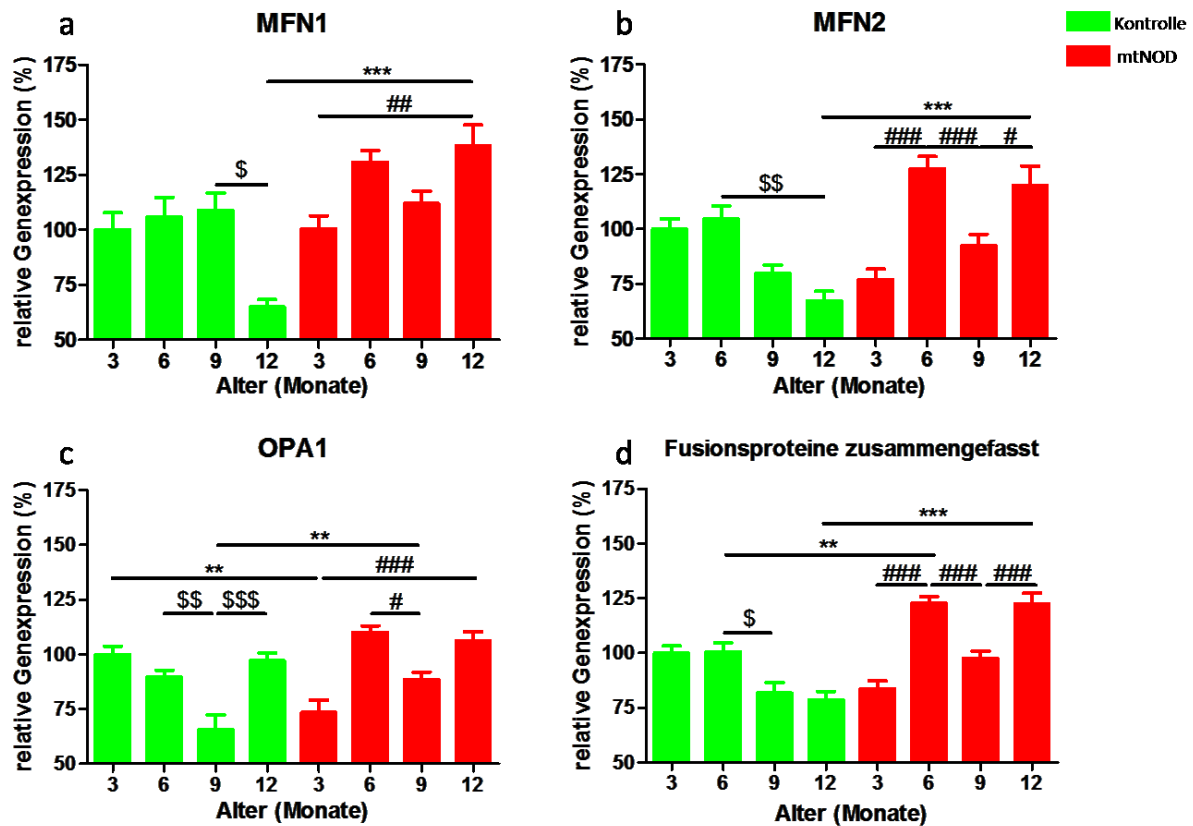


Abbildung 27: Relative Genexpression mitochondrialer Fusionsproteine in Hepatozyten. Quantitative Analyse der altersabhängigen Genexpression von *MFN1* (a), *MFN2* (b), *OPA1* (c) und der zusammengefassten Fusionsproteine (d) des Kontroll- (grün) und des mtNOD-Stamms (rote). Die relative Genexpressionsanalyse wurde jeweils zu GAPDH normalisiert. Per Definition wurde der Mittelwert 3 Monate alter Kontrolltiere auf eine Expressionsrate von 100 % festgelegt (n = 3 Tiere pro Alterszeitpunkt).

3.6.2 Genexpression mitochondrialer Teilungsproteine

Im *FIS1*-Genexpressionsmuster der Hepatozyten von Kontrolltieren war ein transients Maximalwert in 9 Monate alten Tieren zu beobachten (Abbildung 28 a). Im Vergleich zu 3 (25 %), 6 (40 %) und 12 Monate (35 %) alten Tieren, war die Genexpressionsrate zu diesem Zeitpunkt signifikant erhöht. Im *DNM1L*-Expressionsmuster waren keine Unterschiede zu verschiedenen Alterszeitpunkten im Kontrollstamm zu beobachten (Abbildung 28 b). Die Genexpressionsrate von *MFF* 6 und 9 Monate alter Kontrolltiere war, verglichen mit 3 Monate alten Tieren, signifikant um 70 % und um 85 % erhöht (Abbildung 28 c). In 12 Monate alten Tieren war die Expressionsrate wieder um 40 % gegenüber den 9 Monate alten Tieren erniedrigt.

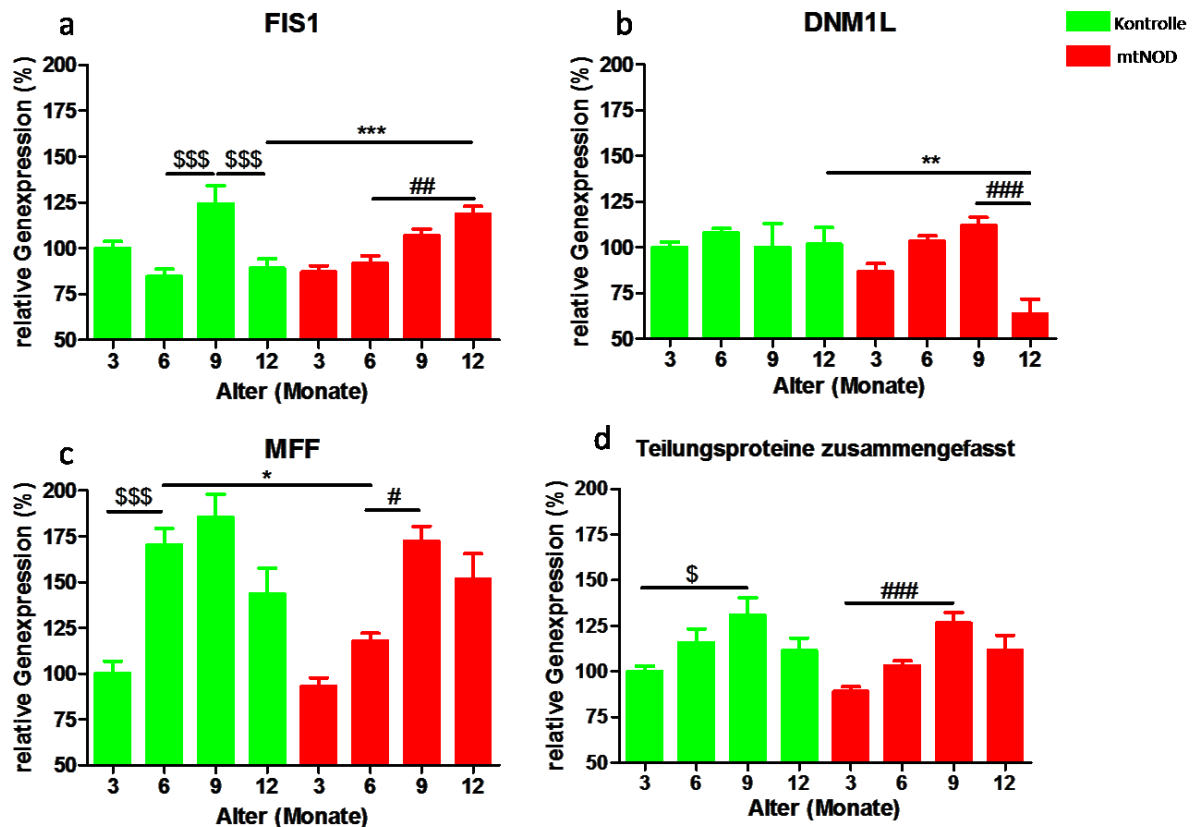


Abbildung 28: Relative Genexpression mitochondrialer Teilungsproteine in Hepatozyten. Quantifizierung der altersabhängigen Genexpression von *FIS1* (a), *DNM1L* (b), *MFF* (c) und der zusammengefassten Teilungsproteine (d) des Kontroll- (grün) und des mtNOD-Stammes (rot) abgebildet. Die relative Genexpressionsanalyse wurde jeweils zu GAPDH normalisiert. Per Definition wurde der Mittelwert 3 Monate alter Kontrolltiere auf eine Expressionsrate von 100 % festgelegt (n = 3 Tiere pro Alterszeitpunkt).

Die *FIS1*-Genexpressionsrate in Hepatozyten des mtNOD-Stammes nahm mit dem Alter kontinuierlich zu. So war sie in 12 Monate alten Tieren signifikant um 30 % höher als in 3 Monate alten Tieren. Auch *DNM1L* zeigte im mtNOD-Stamm einen altersabhängigen kontinuierlichen Anstieg der Genexpressionsrate um 25 % bis zum 9-Monats-Zeitpunkt. Allerdings war anschließend eine signifikante Abnahme der *DNM1L*-Genexpression in 12 Monate alten Tieren zu beobachten. Im Vergleich zu 9 Monate alten Tieren war sie um 50 % geringer. Das *MFF*-Genexpressionsmuster des mtNOD-Stammes war ähnlich dem des Kontrollstammes. Allerdings war eine signifikante Zunahme der Expressionsrate erst in 9 Monate alten Tieren zu beobachten. Im Vergleich mit 6 Monate alten Tieren war diese um 55 % erhöht.

Werden die mitochondrialen Teilungsproteine zusammengefasst, so sind diese in 3 und 6 Monate alten Tieren im Kontrollstamm tendenziell um 10 % stärker exprimiert als im

mtNOD-Stamm. Abgesehen davon war der altersabhängige Verlauf der Genexpressionsrate aller Teilungsproteine vergleichbar (Abbildung 28 d), obwohl sich die Genexpressionsmuster der einzelnen Teilungsproteine teilweise deutlich voneinander unterschieden. In beiden Stämmen kam es zu einem signifikanten Anstieg der Genexpression im Altersverlauf von 3 zu 9 Monaten. Im Alter von 12 Monaten war jeweils eine tendenzielle Abnahme der mitochondrialen Fusionsproteine zu beobachten.

3.6.3 Verhältnis von mitochondrialen Teilungs- und Fusionsproteinen

In Hepatozyten von Kontrolltieren verschob sich das Verhältnis der Genexpressionsrate mitochondrialer Fusions- und Teilungsproteine mit zunehmendem Alter auf die Seite der Teilungsproteine (Abbildung 29 a). Im Gegensatz dazu war in mtNOD-Tieren ein oszillierendes Genexpressionsmuster zu beobachten. Im Vergleich zu 3 Monate alten Tieren wurden in 6 und 12 Monate alten Tieren verhältnismäßig mehr Fusionsproteine exprimiert, während in Hepatozyten 9 Monate alter Tiere deutlich mehr Teilungsproteine exprimiert wurden.

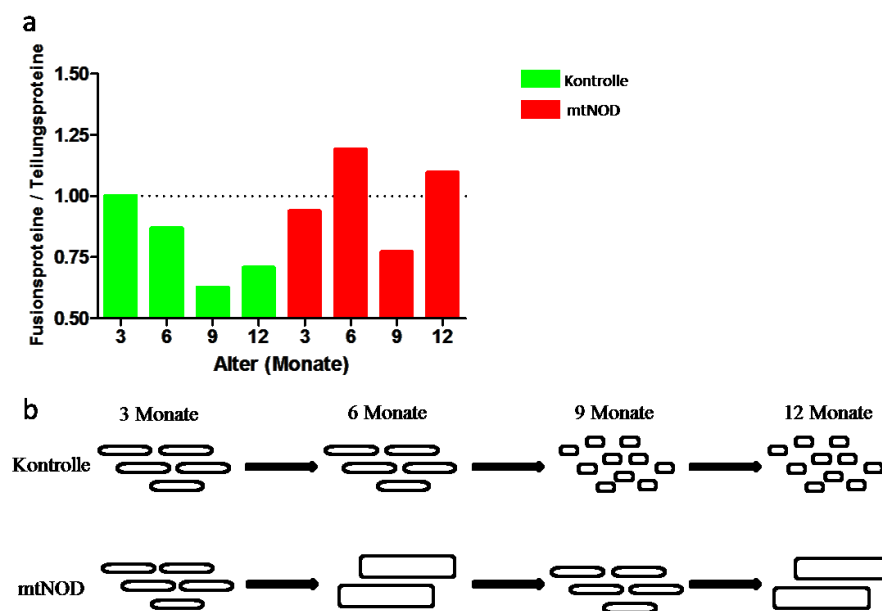


Abbildung 29: Verhältnis der Genexpressionsrate mitochondrialer Fusions- und Teilungsproteine. (a) Auf Grundlage der erhobenen Genexpressionsdaten wurde das Verhältnis zwischen Fusions- und Teilungsproteinen im Alterungsverlauf ermittelt. Für die Darstellung wurden die Mittelwerte der Genexpression aus Abbildung 27 d und Abbildung 28 d verwendet. Grüne Säulen entsprechen Kontrolltieren und rote Säulen entsprechen den mtNOD-Tieren. (b) Aufgrund der Genexpressionsdaten zu erwartender altersabhängiger mitochondrialer Elongationsgrad in den Hepatozyten.

Anhand der ermittelten Genexpressionsdaten mitochondrialer Fusions- und Teilungsproteine, wurde das in Abbildung 29 b gezeigte Schema erstellt, das den zu erwartenden mittleren mitochondrialen Elongationsgrad in Hepatozyten aus Tieren unterschiedlichen Alters darstellt.

3.6.4 Morphologische mitochondriale Analyse

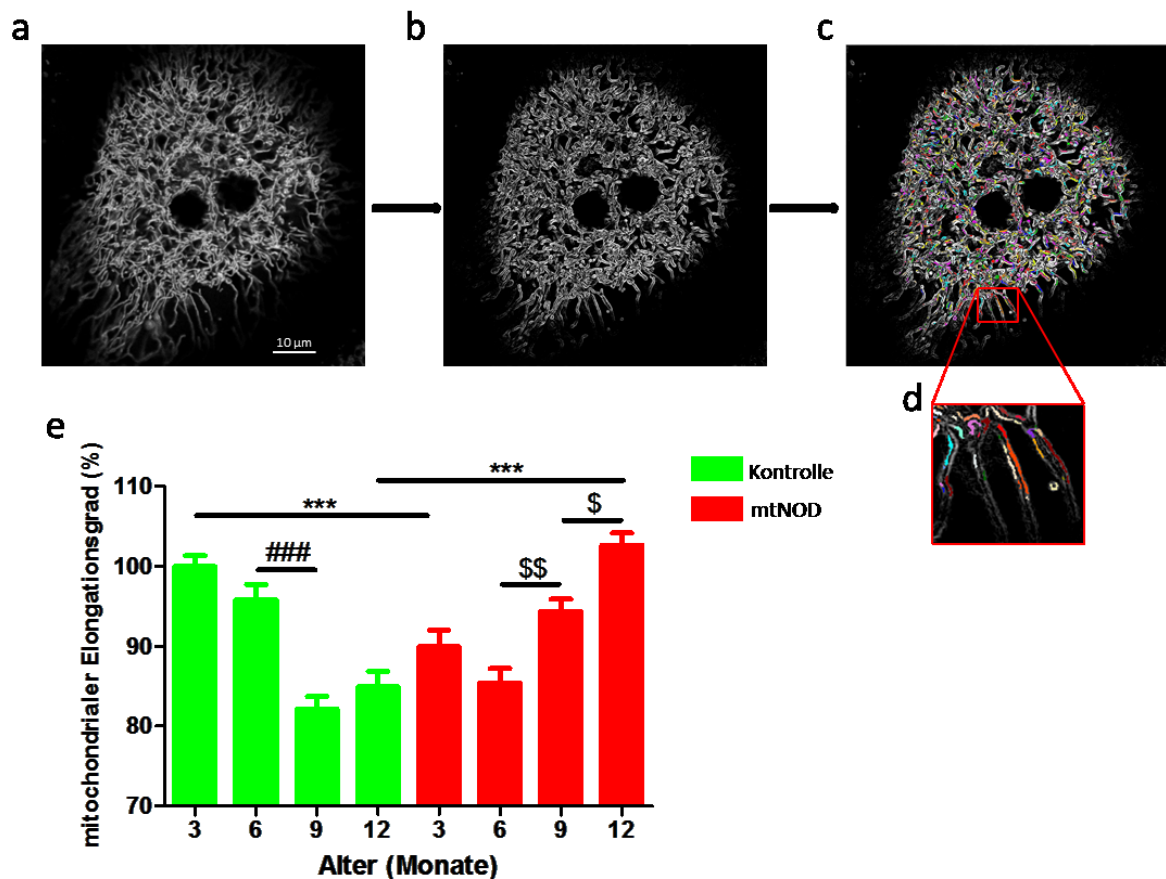


Abbildung 30: Morphologische Analyse des mitochondrialen Elongationsgrades in Hepatozyten. (a) Mitochondrien in Hepatozyten wurden mit MTG angefärbt. (b) Bilder wurden mit ImageJ bearbeitet, um einen stärkeren Kontrast mitochondrialer Strukturen zueinander und zum Hintergrund zu erhalten. (c, d) Die Zirkularität einzelner mitochondrialer Strukturen wurde mit Hilfe der Autoquant Software berechnet. Anschließend wurde die mittlere Zirkularität der von Autoquant erkannten mitochondrialen Strukturen in einer Zelle ermittelt. (e) Quantifizierung der altersabhängigen mitochondrialen Zirkularität in Hepatozyten von Kontroll- (grün) und mtNOD-Tieren (rot). Strukturen, die eine Zirkularität von 1 aufweisen, entsprechen einem perfekten Kreis. Umso größer der Wert wird, desto mehr weicht die Struktur von einer kreisförmigen Struktur ab. Stark elongierte Mitochondrien weisen demnach in der Regel einen höheren Zirkularitätswert auf als stark fragmentierte Mitochondrien. Die mittlere Zirkularität mitochondrialer Strukturen 3 Monate alter Kontrolltiere wurde mit einem mitochondrialen Elongationsgrad von 100 % definiert (n=30 bis 50 Bilder von 3 bis 5 Tieren).

Zur Überprüfung der in Punkt 3.6.3 untersuchten mitochondrialen Dynamik auf Genexpressionsebene, wurde diese zusätzlich auch morphologisch analysiert. Hierbei nahm die mitochondriale Elongation in Hepatozyten 9 und 12 Monate alter Kontrolltiere im Vergleich zu 3 und 6 Monate alten Tieren signifikant um 15 % ab (Abbildung 30). Im Gegensatz dazu nahm die mitochondriale Elongationsgrad in Hepatozyten 12 Monate alter mtNOD-Tiere im Vergleich zu 3 und 6 Monate alten Tieren um 15 % zu.

Die Ergebnisse der morphologischen Untersuchung und der Genexpressionsuntersuchung (Abbildung 29) zeigten die gleiche Tendenz bei der altersabhängigen Veränderung der mitochondrialen Struktur. Beiden Auswertemethoden deuteten in Hepatozyten 9 und 12 Monate alter Kontrolltiere auf eine verstärkte mitochondriale Fragmentierung hin. Im Gegensatz dazu konnte nach beiden Auswertemethoden in Hepatozyten des mtNOD-Stammes im Alter ein erhöhter mitochondrialer Elongationsgrad festgestellt werden. Allerdings konnte eine verstärkte mitochondriale Elongation in Hepatozyten 6 Monate alter mtNOD-Tiere, welche nach den Genexpressionsdaten zu erwarten gewesen wäre, nach der morphologischen Auswertung nicht beobachtet werden.

3.7 Mitophagie und Apoptose

Bei mitochondrialen Teilungsprozessen entstandene defekte Tochtermitochondrien können durch Mitophagie beseitigt werden. Bei dem Prozess der Mitophagie nehmen die Proteine PINK1 und Parkin eine bedeutende Rolle ein. PINK1 akkumuliert an Mitochondrien mit niedrigem MMP und rekrutiert so Parkin, welches Mitophagie initiiert. Außerdem kann PINK1 TRAP1 phosphorylieren. Phosphoryliertes TRAP1 wiederum stabilisiert COX in der inneren mitochondrialen Membran und verhindert die Freisetzung von Cytochrom *c*, wodurch einer Apoptose entgegengewirkt werden kann (siehe Punkt 1.4.3).

Die *PINK1*-Genexpressionsrate war im Kontrollstamm im Alter von 3 bis 9 Monaten auf konstantem Niveau (Abbildung 31 a). Im Alter von 12 Monaten war eine signifikante Abnahme der Expressionsrate um 20 % zu beobachten. Im mtNOD-Stamm war die Expressionsrate von *PINK1* in 6 Monate alten Tieren um 15 % höher als in 3 Monate alten Tieren und bleibt mit zunehmendem Alter unverändert. Im Vergleich zu 12 Monate alten Kontrolltieren war die Expressionsrate von *PINK1* in 12 Monate alten mtNOD-Tieren signifikant um 30 % erhöht. Im Gegensatz dazu war sie in 3 Monate alten Kontrolltieren um 20 % höher als in mtNOD-Tieren des gleichen Alters.

Die Genexpressionsrate von *PARK2* (kodiert für das Protein Parkin) war in 9 Monate alten Tieren in beiden Stämmen im Vergleich zu 3 Monate alten Tieren signifikant erhöht. Im Kontrollstamm war diese um 190 % und im mtNOD-Stamm um 150 % erhöht (Abbildung 31 b). In 12 Monate alten mtNOD-Tieren war die Expressionsrate unverändert hoch, während diese in Kontrolltieren signifikant um 215 % abnahm. Entsprechend war auch die Genexpression 12 Monate alter mtNOD-Tiere signifikant höher als die der Kontrolltiere gleichen Alters.

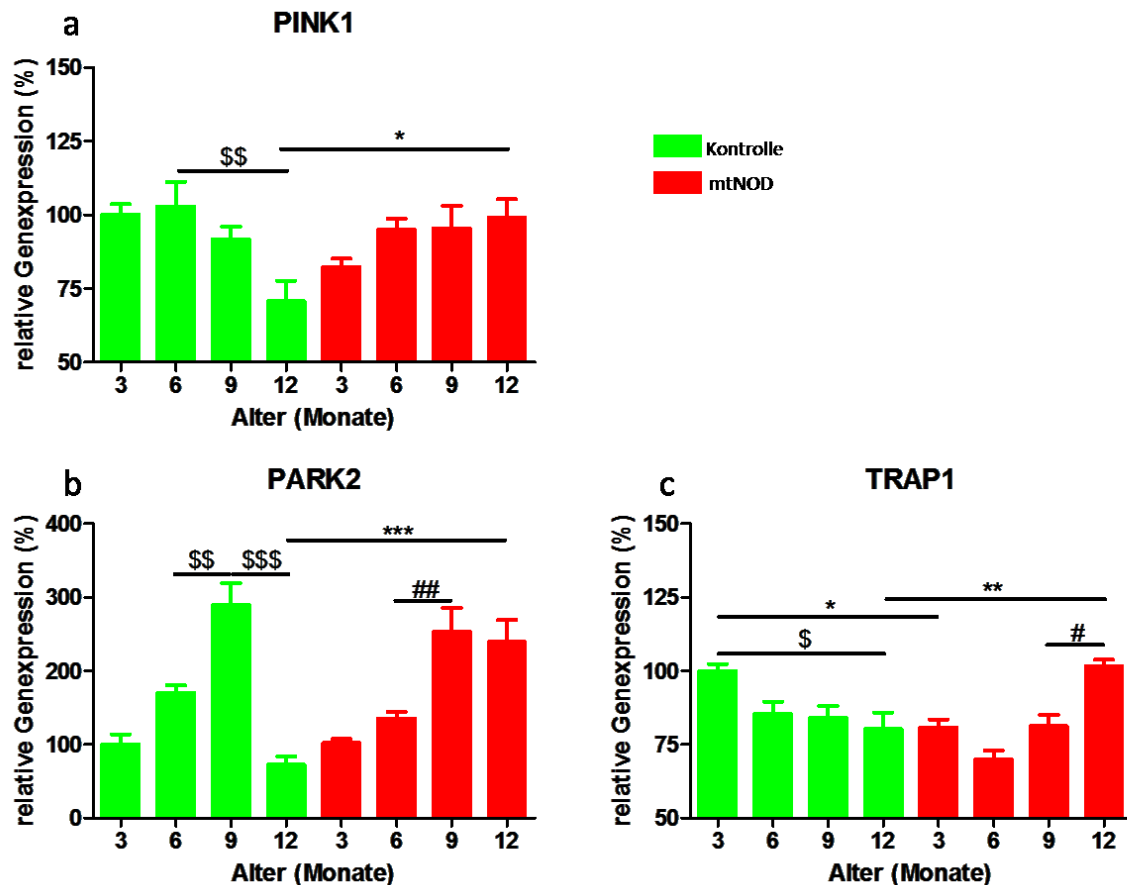


Abbildung 31: Relative Genexpressionsanalyse von Mitophagie- und Apoptosemarkern in Hepatozyten. Es sind Säulendiagramme der altersabhängigen Genexpression von *PINK1* (a), *PARK2* (b) und *TRAP1* (c) im Kontroll- (grüne Säulen) und im mtNOD-Stamm (rote Säulen) abgebildet. Die relative Genexpressionsanalyse wurde jeweils zu GAPDH normalisiert. Per Definition wurde der Mittelwert 3 Monate alter Kontrolltiere auf eine Expressionsrate von 100 % festgelegt (n = 3 Tiere pro Alterszeitpunkt).

Die *TRAP1*-Genexpressionsrate war in Hepatozyten 12 Monate alter Tiere des Kontrollstammes signifikant um 20 % im Vergleich zu 3 Monate alten Tieren erniedrigt (Abbildung 31 c). In den Hepatozyten des mtNOD-Stammes war zum 12-Monats-Zeitpunkt ein starker signifikanter Anstieg um 20 % Vergleich zu 3 Monate alten Tieren zu beobachten.

Gegenüber Hepatozyten 3 Monate alter mtNOD-Tieren war die Expressionsrate in Kontrolltieren um 20 % signifikant erhöht. Bei 12 Monate alten Tieren konnte das Gegenteil gezeigt werden.

Zusammengefasst konnte im Kontrollstamm im Alter eine verringerte und im mtNOD-Stamm eine erhöhte Genexpression der Mitophagie initiiierenden Proteine PINK1 und PARK2 und des Apoptose hemmenden Protein TRAP1 beobachtet werden.

3.8 Mitochondriales Netzwerk und mitochondriale Strukturen in der Leber

Neben der Analyse mitochondrialer Detailstrukturen in isolierten Hepatozyten wurde auch die Homogenität des mitochondrialen Netzwerkes in Lebergewebe analysiert.

3.8.1 Loopförmige mitochondriale Strukturen

Bei der Analyse des mitochondrialen Elongationsgrades (3.6.4) war das Auftreten loopförmiger Mitochondrien auffällig. Daher sollte ihr Auftreten quantifiziert und ihre Dynamik untersucht werden.

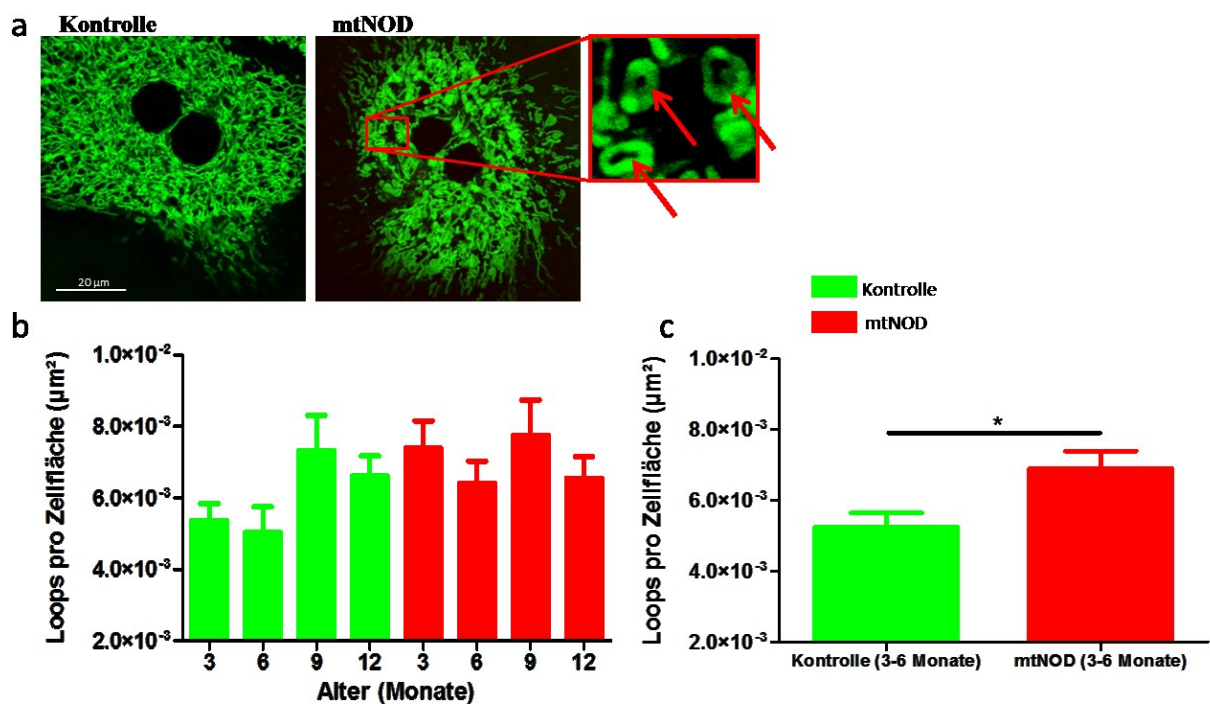


Abbildung 32: Quantifizierung loopförmiger mitochondrialer Strukturen (Loops) in Hepatozyten. (a) Loops (rote Pfeile) wurden in mit MTG gefärbten Hepatozyten des Kontroll- und des mtNOD-Stammes pro Flächeneinheit ermittelt. (b) Quantitative Auswertung (n = 20–50 Bilder von 4–10 Tieren). (c) Auswertung mit zusammengefassten Daten der jungen Kontroll- und mtNOD-Tiere (Mittelwert in Loops/ $\mu\text{m}^2 \pm \text{SEM}$; * $p < 0,05$, student's t-Test).

Der Anteil loopförmiger Mitochondrien im mitochondrialen Netzwerk blieb über das Alter in Hepatozyten des mtNOD-Stamms konstant. Verglichen mit Hepatozyten der mtNOD-Tiere und 9 und 12 Monate alter Kontrolltiere war der Anteil dieser Strukturen in 3 und 6 Monate alten Kontrolltieren geringer. Ein signifikanter Unterschied des Anteils loopförmiger mitochondrialer Strukturen war demnach in Hepatozyten 3 und 6 Monate alter mtNOD-Tieren gegenüber Kontrolltieren gleichen Alters zu beobachten (Abbildung 32).

Durch Lokalisierung des photokonvertierbaren Proteins Dendra2 in der MIM konnten Mitochondrien fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden. Durch punktgenaue Photokonversion zum stabil rot fluoreszierenden Dendra2 konnten die Dynamik einzelner Mitochondrien analysiert werden.

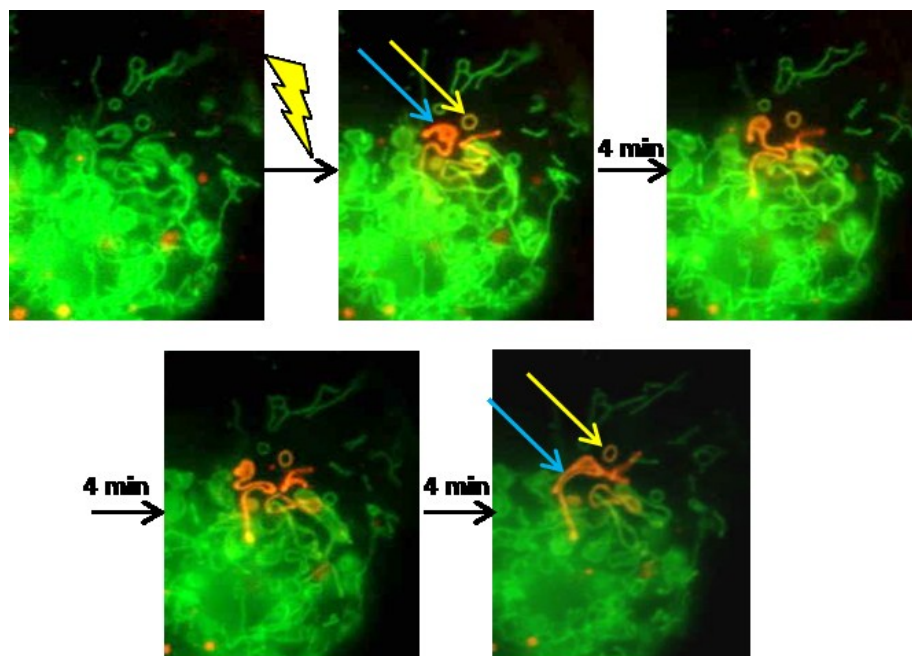


Abbildung 33: Analyse der Dynamik unterschiedlicher mitochondrialer Strukturen. Die Zelle wurde mit Dendra2-Mito transfiziert. Jeweils ein Mitochondrium mit loopförmiger Struktur (gelbe Pfeile) und ein Mitochondrium mit elongierter Struktur (blaue Pfeile) wurden mit Licht einer Wellenlänge von 405 nm bestrahlt. Durch Photokonvertierung des Dendra2 Proteins in den entsprechenden Mitochondrien verschob sich das Emissionsspektrum in den roten Wellenlängenbereich. Es wurde alle 4 min eine Aufnahme des Hepatozyten gemacht, um die Dynamik der entsprechenden Mitochondrien beobachten zu können.

In Abbildung 33 sind Unterschiede der mitochondrialen Dynamik in Mitochondrien mit loopförmiger und elongierter Struktur zu erkennen. Während ein elongiertes Mitochondrium im untersuchten Zeitintervall deutliche Konformationsänderungen zeigte, waren diese in loopförmigen Mitochondrium nicht zu erkennen. Dessen Form verblieb unverändert. Solche

loopförmigen Mitochondrien erscheinen nicht mehr Teil des mitochondrialen Netzwerks im Hepatozyten zu sein.

3.8.2 Mitochondriales Netzwerk

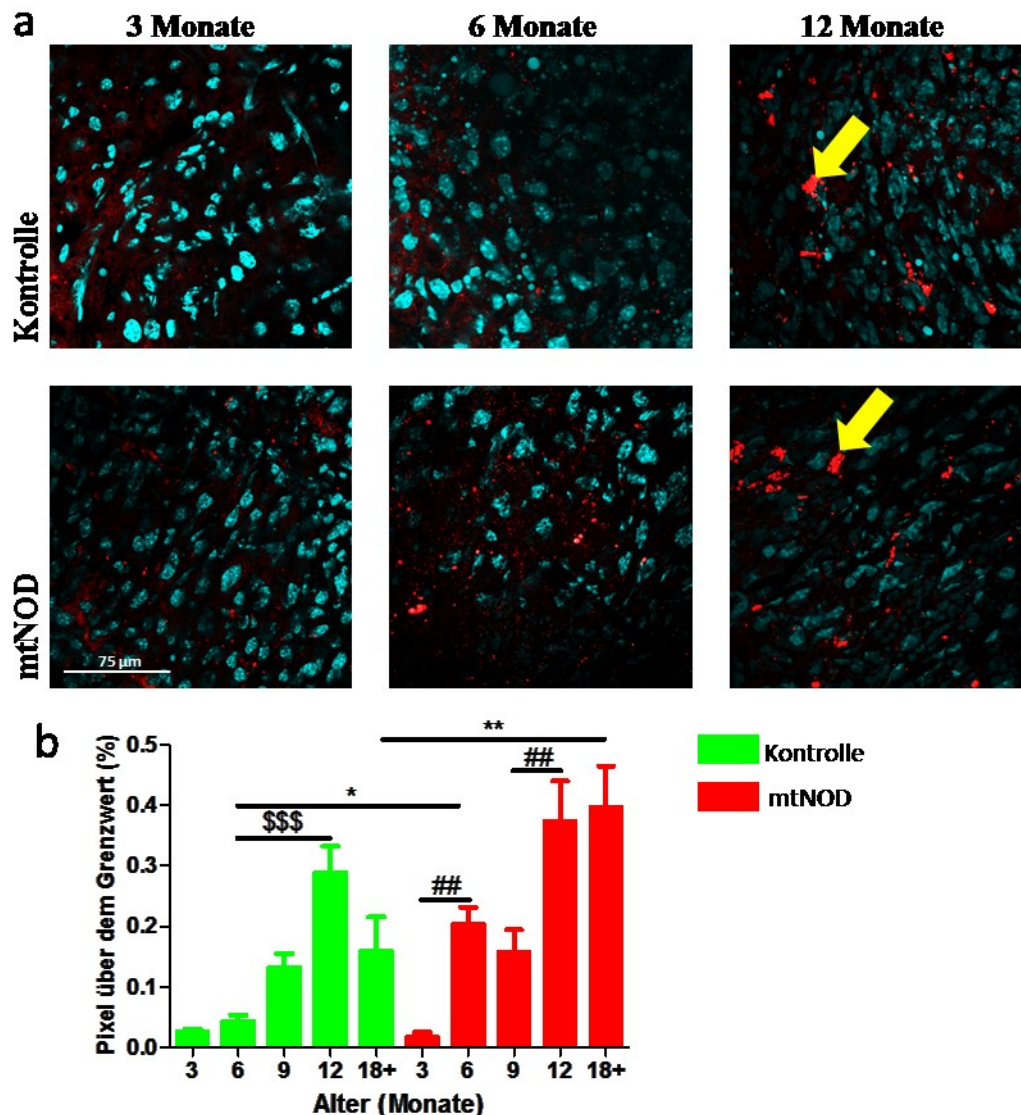


Abbildung 34: Analyse des mitochondrialen Netzwerks in Lebergewebe. (a) Beispiele fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen 3, 6 und 12 Monate alter Kontroll- und mtNOD-Tiere (MitoTracker® Deep Red: Rot, DAPI: blau). Rote stark fluoreszierende Bereiche (gelbe Pfeile) entsprechen akkumulierten mitochondrialen Strukturen im Gewebe. Dies deutet auf einen Verlust der homogenen mitochondrialen Netzwerkstruktur in diesem Bereich hin. (b) Quantitative Auswertung der Homogenität der mitochondrialen Netzwerkstruktur im Lebergewebe von Kontroll- (grüne Säulen) und mtNOD-Tieren (rote Säulen). Es wurde der prozentuale Anteil von Pixeln mit einer Fluoreszenzintensität > 1000 im entsprechenden Fluoreszenzkanal der Aufnahmen bestimmt. Je höher der Wert ist, desto inhomogener ist die mitochondriale Netzwerkstruktur im Gewebe (n = 15–30 Bilder von 3–6 Tieren).

In beiden Stämmen nahm der Anteil von akkumulierten Mitochondrien im Lebergewebe mit dem Alter zu (Abbildung 34). Somit kam es in beiden Stämmen zu einem kontinuierlichen altersabhängigen Verlust der homogenen mitochondrialen Netzwerkstruktur. Allerdings konnte ein signifikanter Anstieg akkumulierter Mitochondrien in den mtNOD-Tieren bereits zum 6-Monats-Zeitpunkt beobachtet werden. In Kontrolltieren konnte in diesem Alter lediglich ein minimaler Anstieg dieser Strukturen detektiert werden. Dementsprechend war der Anteil akkumulierter Mitochondrien in Lebergewebe 6 Monate alter mtNOD-Tiere signifikant erhöht gegenüber Kontrolltieren des gleichen Alters. Auch in weiteren untersuchten konplastischen Mausstämmen war im Alter von 6 Monaten noch eine homogene Netzwerkstruktur zu beobachten (siehe Punkt 6.3, Abbildung 42).

Der Anteil akkumulierter Mitochondrien in 18 und 24 Monate alten Kontrolltieren nahm im Vergleich zu 12 Monate alten Tieren ab. Dies war im mtNOD-Stamm nicht zu beobachten.

3.9 Parallele Messung cytosolischer und mitochondrialer Ca^{2+} -Konzentration

In dem folgenden Teil der Arbeit ist die zeitliche Veränderung der Ca^{2+} -Konzentration in Cytosol und den Mitochondrien von Hepatozyten nach verschiedenen Stimuli dargestellt. In den Punkten 3.9.1 und 3.9.2 wurde der zeitliche Verlauf der Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol bzw. in den Mitochondrien nach Einstellung einer 25 mmol/l Glukosekonzentration im zuvor nährstoffarmen Medium analysiert. In den Punkten 3.9.3 und 3.9.4 wurde der zeitliche Verlauf der cytosolischen und mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration nach Einstellung einer FCCP-Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ im Medium analysiert. Des Weiteren wurden altersabhängige Genexpressionsraten mitochondrialer Calciumkanäle und ausgewählter regulatorischer Einheiten ermittelt (Punkt 3.9.5).

3.9.1 Cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Glukosegabe

In gehungerten Hepatozyten beider Stämme kam es jeweils zu einem Ca^{2+} -Einstrom in das Cytoplasma, nachdem eine Glukosekonzentration von 25 mmol/l im Medium eingestellt worden war (Abbildung 35 a–d). Allerdings war dieser in Hepatozyten 3 Monate alter mtNOD-Tiere höher als in Kontrolltieren des gleichen Alters. Mit zunehmenden Alter kam es im Kontrollstamm zu einer Erhöhung des cytosolischen Ca^{2+} -Einstrom nach Glukosestimulus. So ist dieser in Hepatozyten 12 Monate alter Tiere signifikant gegenüber Hepatozyten 3 und 6 Monate alter Tiere erhöht. Dieser Effekt war in Hepatozyten des mtNOD-Stammes nicht zu beobachten. Der cytosolische Ca^{2+} -Einstrom war in diesem Stamm in 12 Monate alten Tieren tendenziell niedriger als in 3 Monate alten Tieren. Außerdem war er signifikant niedriger als

a 3 Monate

relative Fluoreszenzintensität

Zeit (min)

b 6 Monate

relative Fluoreszenzintensität

Zeit (min)

c 9 Monate

relative Fluoreszenzintensität

Zeit (min)

d 12 Monate

relative Fluoreszenzintensität

Zeit (min)

e

AUC

Alter (Monate)

Legend: ■ Kontrolle, ■ mtNOD

Statistical significance: ** (p < 0.01), ** (p < 0.01)

73

3.9.2 Mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration nach Glukosegabe

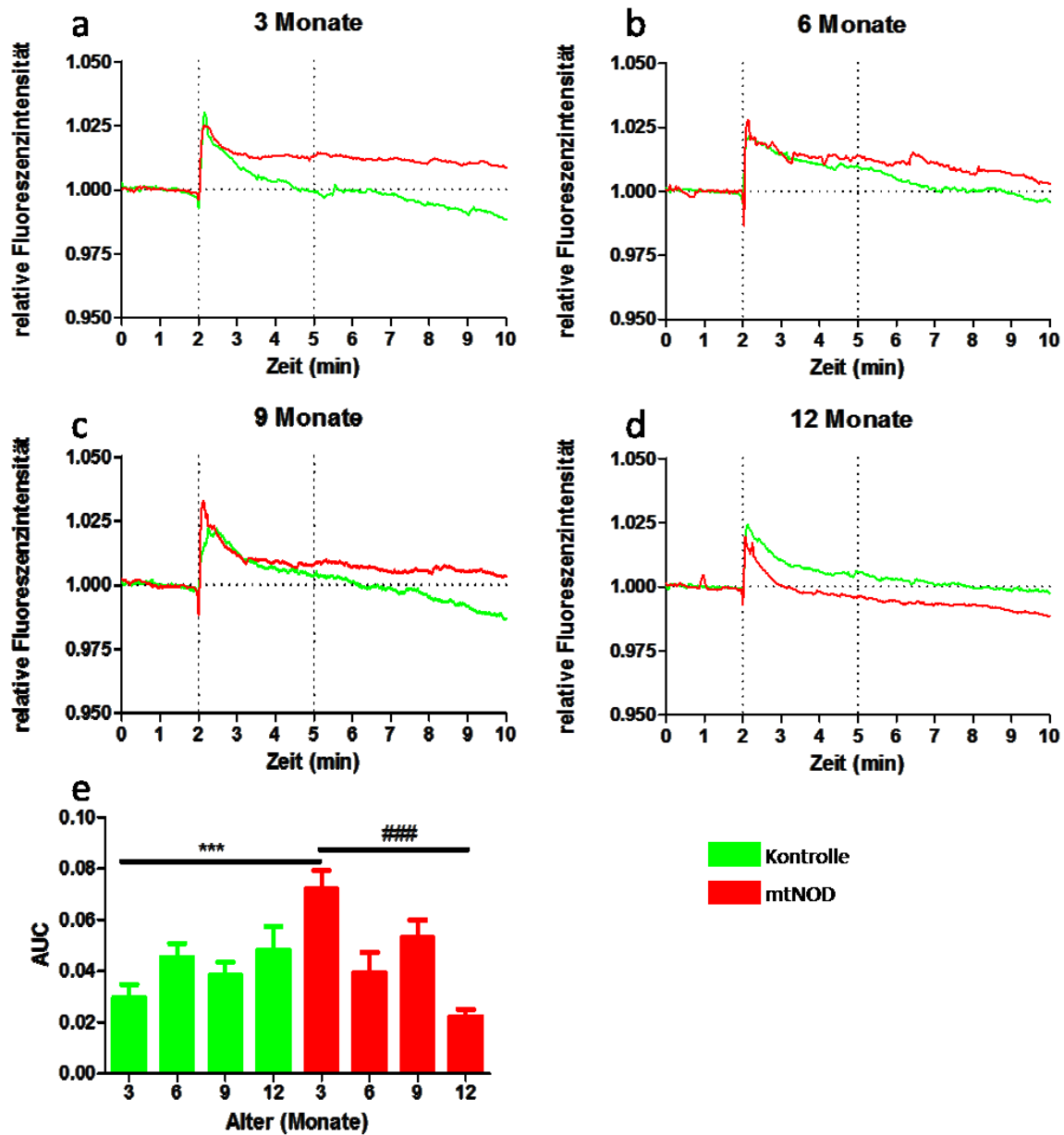


Abbildung 36: Zeitlicher Verlauf der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration nach Glukosegabe (25 mmol/l) in Hepatozyten. Je höher die Ca^{2+} -Konzentration in den Mitochondrien war, desto stärker ist die Fluoreszenzintensität des mitochondrialen GEM-GECCO1-Proteins. (a–d) Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität des GEM-GECCO1-Proteins in den Mitochondrien der Hepatozyten von 3, 6, 9 und 12 Monate alten Kontroll- (grüne Kurven) und mtNOD-Tieren (rote Kurven). Jeweils nach 2 min wurde eine Glukosekonzentration von 25 mmol/l im Medium eingestellt. (e) In beiden Stämmen wurde zu den verschiedenen Alterszeitpunkten die Fläche unter der Kurve (area under the curve, AUC) im Zeitraum von 2 bis 5 min zur Baseline 1,0 auf der y-Achse ermittelt (n = 9–18 Hepatozyten von je 3 Tieren).

Es kam jeweils nach Glukose-Stimulus zu einem Ca^{2+} -Einstrom in die Matrix der Mitochondrien der gehungerten Hepatozyten (Abbildung 36 a–d). In Kontrolltieren nahm der mitochondriale Ca^{2+} -Einstrom mit dem Alter in der Tendenz zu, während dieser in den mtNOD-Tieren im Alter signifikant deutlich abnahm. Beim Vergleich des altersabhängigen Ca^{2+} -Einstroms zwischen den beiden Stämmen war zu beobachten, dass dieser in jungen 3 Monate alten mtNOD-Tieren ebenfalls signifikant deutlich erhöht gegenüber Kontrolltieren des gleichen Alters war. Im Gegensatz dazu war der mitochondriale Ca^{2+} -Einstrom in 12 Monate alten Kontrolltieren tendenziell höher als in 12 Monate alten mtNOD-Tieren (Abbildung 36 e).

3.9.3 Cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach FCCP-Zusatz

In Hepatozyten 3 und 6 Monate alter Kontrolltiere war kein erhöhter Ca^{2+} -Einstrom nach FCCP-Zusatz zu beobachten (Abbildung 37 a). Im Gegensatz dazu kam es im Cytosol der Hepatozyten 9 und 12 Monate alter Kontrolltiere zu einem deutlichen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration nach FCCP-Zusatz (Abbildung 37 b). Der Anstieg der Regressionsgraden der einzelnen Fluoreszenzintensitätsmessungen in den Hepatozyten war in den alten Kontrolltieren signifikant höher als in den jungen Kontrolltieren (Abbildung 37 c). In den Hepatozyten der mtNOD-Tiere war ein zu den Kontrolltieren gegenläufiges Muster zu beobachten. So war ein stärkerer cytosolischer Ca^{2+} -Einstrom nach FCCP-Zusatz in der jungen Tiergruppe zu beobachten. Dieser war auf ähnlichem Niveau wie in der alten Tiergruppe des Kontrollstammes. Der cytosolische Ca^{2+} -Einstrom in den Hepatozyten alter mtNOD-Tiere war ähnlich niedrig wie in der jungen Tiergruppe des Kontrollstamms. Allerdings zeigen die gemessenen Fluoreszenzveränderungen sehr unterschiedliche Verläufe. Auffällig war, dass in der alten mtNOD-Tiergruppe zunächst für ca. 1 min ein Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration, ähnlich dem der jungen mtNOD-Tiere, detektiert wurde, dem dann aber ein deutlicher Abfall der Fluoreszenzintensität folgte.

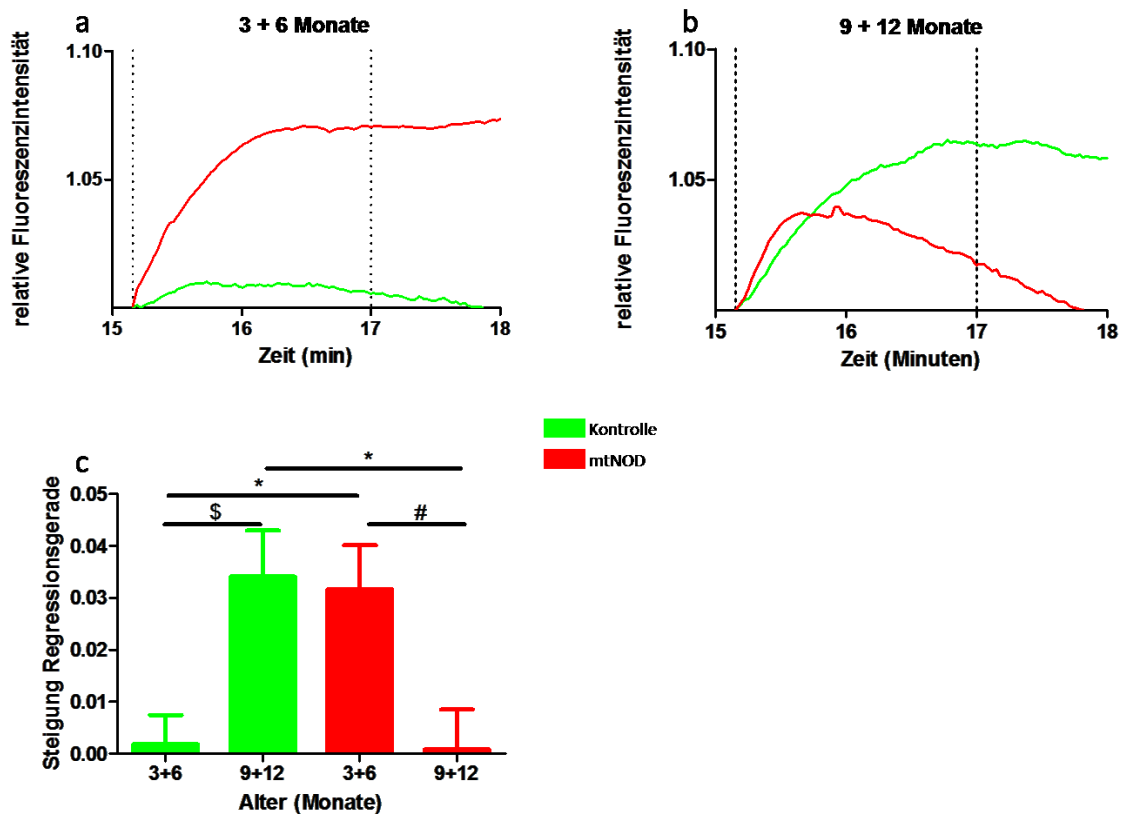


Abbildung 37: Cytosolischer Ca^{2+} -Einstrom in Hepatozyten nach FCCP-Zusatz ($10 \mu\text{mol/l}$). Je höher die Ca^{2+} -Konzentration im Cytoplasma ist, desto stärker ist die Fluoreszenzintensität des cytosolischen CAR-GECO1-Proteins. (a, b) Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität des CAR-GECO1-Proteins im Cytoplasma der Hepatozyten von 3 + 6 und 9 + 12 Monate alten Kontroll- (grüne Kurven) und mtNOD-Tieren (rote Kurven). Jeweils zum Zeitpunkt 15 min wurde eine FCCP-Konzentration von $10 \mu\text{mol/l}$ im Medium eingestellt. (c) In den Tiergruppen beider Stämme wurde jeweils die Steigung der Regressionsgerade der Fluoreszenzintensität vom Zeitraum 910 s bis 1020 s bestimmt ($n = 18$ Hepatozyten von je 6 Tieren).

3.9.4 Mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration nach FCCP-Zusatz

Nach FCCP-Zusatz kam es in den Hepatozyten jeweils zu einem mitochondrialen Ca^{2+} -Ausstrom (Abbildung 38 a–b). Dieser war in Hepatozyten 3 und 6 Monate alter Tiere auf ähnlichem Niveau in beiden Tierstämmen (Abbildung 38 a, c). Tendenziell nahm die Intensität des mitochondrialen Ca^{2+} -Ausstroms in älteren Kontrolltieren ab, während er in älteren mtNOD-Tieren tendenziell zunahm. Entsprechend war dieser in 9 und 12 Monate alten mtNOD-Tieren signifikant höher als in Kontrolltieren des gleichen Alters (Abbildung 38 c).

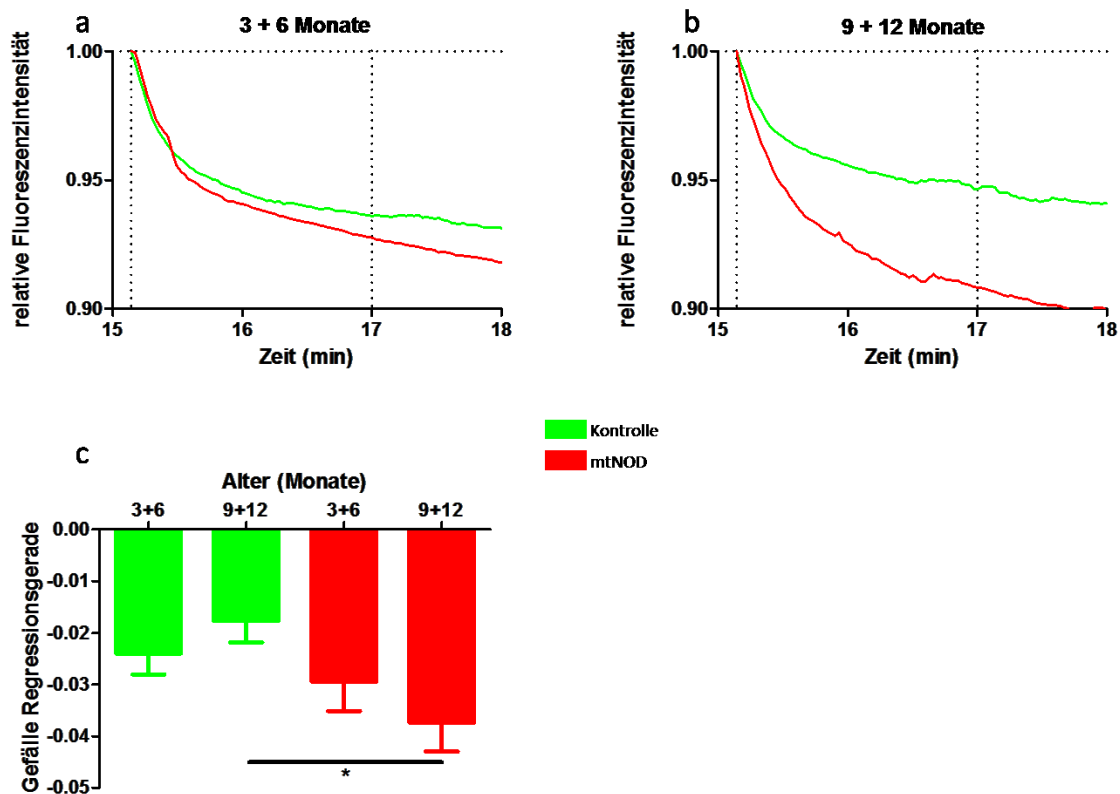


Abbildung 38: Mitochondrialer Ca^{2+} -Ausstrom in Hepatozyten nach FCCP-Zusatz ($10 \mu\text{mol/l}$). Je höher die Ca^{2+} -Konzentration in den Mitochondrien ist, desto stärker ist die Fluoreszenzintensität des mitochondrialen GEM-GECO1-Proteins. (a–b) Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität des GEM-GECO1-Proteins in den Mitochondrien der Hepatozyten von 3 + 6 und 9 + 12 Monate alten Kontroll- (grün) und mtNOD-Tieren (rot). Jeweils zum Zeitpunkt 15 min wurde eine FCCP-Konzentration von $10 \mu\text{mol/l}$ im Medium eingestellt. (c) In den Tiergruppen beider Stämme wurde jeweils die Steigung der Regressionsgerade der Fluoreszenzintensität vom Zeitraum 910 s bis 1020 s bestimmt ($n = 18$ Hepatozyten von je 6 Tieren).

3.9.5 Genexpressionsrate mitochondrialer Calciumkanäle

Die *MCU*-Genexpressionsrate war in den Kontrolltieren im Alter unverändert (Abbildung 39 a). Allerdings waren die Expressionsraten von den Genen der regulatorischen Untereinheiten *MICU1* (Abbildung 39 c) und *SLC25a23* (Abbildung 39 d) zum 12-Monats-Zeitpunkt verglichen mit 3 Monate alten Tieren um 30 % verringert. In den mtNOD-Tieren hingegen waren sowohl die Expressionsrate von *MCU* als auch die Expressionsraten von *MICU1* und *SLC25a23* im Alter signifikant höher. *MCU* wurde in 12 Monate alten Tieren um 125 %, *MICU1* um 35 % und *SLC25a23* um 55 % verstärkt exprimiert.

Beim Vergleich der Genexpressionsraten zwischen den beiden Stämmen war zu beobachten, dass im Alter von 12 Monaten sowohl *MCU* um 95 % als auch die Gene der beiden regulatorischen Einheiten um 35 % (*MICU1*) und 60 % (*SLC25a23*) signifikant stärker in den

Hepatozyten der mtNOD-Mäuse exprimiert wurden als in den Kontrollmäusen. Im Gegensatz dazu war in 3 Monate alten Tieren die Expressionsrate von *MICU1* signifikant um 30 % höher als in mtNOD-Tieren. Auch *MCU* und *SLC25a23* wurden in 3 Monate alten Kontrolltieren in der Tendenz stärker exprimiert als in den mtNOD-Tieren.

VDAC1 ist der am stärksten exprimierte Kanal in der MAM und ist für Ca^{2+} durchlässig. In 12 Monate alten Kontrolltieren war die *VDAC1*-Expressionsrate signifikant um 35 % verringert, während keine altersabhängige Veränderung der Expressionsrate im mtNOD-Stamm zu beobachten war (Abbildung 39 b).

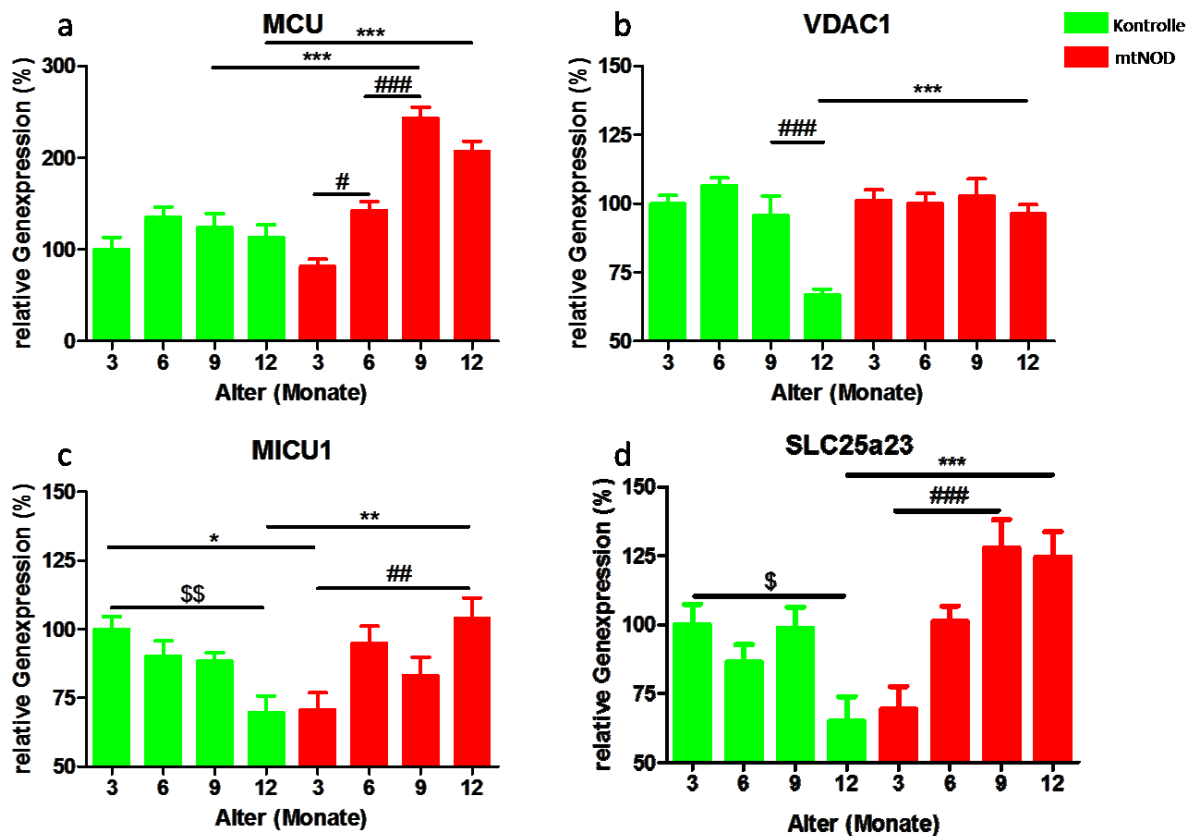


Abbildung 39: Relative Genexpressionsanalyse mitochondrialer Calciumkanäle und entsprechender regulatorischer Einheiten in Hepatozyten. Es ist die qualitative Auswertung der altersabhängigen Genexpression von *MCU* (a), *VDAC1* (b) *MICU1* (c) und *SLC25a23* (d) im Kontroll- (grüne Säulen) und im mtNOD-Stamm (rote Säulen) abgebildet. Die relative Genexpressionsanalyse wurde jeweils zu GAPDH normalisiert. Per Definition wurde der Mittelwert 3 Monate alter Kontrolltiere auf eine Expressionsrate von 100 % festgelegt (n = 3 Tiere pro Alterszeitpunkt).

4 Diskussion

Mutationen der mtDNA können die Alterungsprozesse in Organismen beschleunigen, indem sie Ursache bzw. Folge einer erhöhten ROS-Produktion während der Zellatmung sein können [123, 126]. Um dies zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit der C57BL/6NTac Inzuchtstamm (Kontrolle) und der konplastische C57BL/6NTac-mt^{NODLJ}-Stamm (mtNOD) verwendet. Der mtNOD-Stamm trägt im Vergleich zum Kontrollstamm eine Punktmutation im mitochondrial kodierten Gen der Untereinheit 3 des Komplex IV (COX3) der Atmungskette und eine Veränderung in der Adenin-Folge der DHU-Schleife der tRNA-Arginin.

COX3 ist Bestandteil des katalytischen Kerns des Komplex IV. Seine genaue Funktion ist noch nicht bekannt. Neuere Studien lassen allerdings eine Beteiligung an der Ausbildung von Superkomplexen in der MIM vermuten [7]. So kommen z.B. in Mitochondrien von Säugetierzellen Superkomplexe vor, die aus den Komplexen I, III und IV bestehen [165]. Dabei soll der Verbund von Komplex III und Komplex IV für einen verbesserten Elektronentransfer über Cytochrom *c* sorgen. COX3 spielt wohl eine wichtige Rolle die Konnektivität von Komplex III und Komplex IV innerhalb der Superkomplexe zu stabilisieren [7]. Entsprechend könnte eine Mutation im Gen dieser Untereinheit zur Destabilisierung des Superkomplexes führen. Ein Verlust von Superkomplexstrukturen in der MIM hat einen ineffizienten und langsameren Elektronentransfer in der mitochondrialen Atmungskette zur Folge [166]. Dies bedeutet, dass Redox-Komponenten der Atmungskettenkomplexe länger im reduzierten Zustand verweilen, was die Wahrscheinlichkeit der ROS-Generierung erhöht [166]. So konnte in Mitochondrien einer Myoblast Zelllinie der Maus (C2C12) gezeigt werden, dass Beeinträchtigungen der Assemblierung des III₂-IV₂-Superkomplexes eine erhöhte ROS-Produktion zur Folge haben [167].

Zunächst wurde in Mäusen beider Stämme die altersabhängige ROS-Produktion in Leber, Muskel- und Gehirngewebe analysiert. Zusätzlich wurden verschiedene Parameter der altersabhängigen allgemeinen oxidativen Verteidigung, der basalen Metabolismusrate, der mitochondrialen Dynamik und Morphologie sowie der Calciumhomöostase in der Leber beider Tierstämme ermittelt. Verglichen mit dem Kontrollstamm werden veränderte ROS-Produktionen im mtNOD-Stamm in dieser Arbeit der Punktmutation in *COX3* zugeschrieben, da dadurch die Stabilität des Superkomplexes negativ beeinflusst werden könnte. Trotzdem ist in diesem Stamm ein Einfluss der veränderten tRNA-Arginin auf die ROS-Produktion und die allgemeine oxidative Verteidigung nicht auszuschließen.

4.1 Altersabhängige ROS-Produktion in der Leber, dem Gehirn und dem Muskel

Im Muskel und im Gehirn war eine Erhöhung der ROS-Produktion in beiden Stämmen zu beobachten. Diese Beobachtung entspricht der Theorie freier Radikale im Alterungsprozess von Denham Harman [123] und der Hypothese der graduellen ROS-Antwort von Siegfried Hekimi [126]. So gehen sowohl Denham Harman als auch Siegfried Hekimi davon aus, dass es in Organismen zu einem Anstieg der ROS-Produktion im Alter kommt. Allerdings postulierte Harman, dass ROS Ursache von Alterung sind [123], während Hekimi die These aufstellte, dass eine erhöhte ROS-Produktion Folge von altersbedingten Prozessen ist [126]. Nach Hekimi stellen demnach ROS beutende Signalmoleküle dar, die cytoprotektive Stoffwechselwege einleiten können.

Auffällig war, dass sowohl im Muskel als auch im Gehirn die ROS-Produktion in jungen (3 und 6 Monate) mtNOD-Tieren höher war als in den Kontrolltieren. Des Weiteren konnte eine erhöhte ROS-Produktion im mtNOD-Stamm in beiden Geweben bereits nach 12 Monaten detektiert werden, während eine extreme Zunahme der ROS-Produktion im Kontrollstamm erst ab einem Alter von 18 Monaten beobachtet werden konnte. Außerdem war auffällig, dass im Gehirn der Maximalwert der ROS-Produktion im mtNOD-Stamm in 12 Monate alten Tieren deutlich höher war als der Maximalwert innerhalb des Kontrollstammes in 18 und 24 Monate alten Tieren. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Mutation in COX3 schon in jungen Jahren zelluläre Dysfunktionen zur Folge hatte. Entsprechend führte diese Mutation zu früher einsetzendem und altersbedingt erhöhtem oxidativen Stress. Dies könnte darauf hindeuten, dass es einen Zusammenhang im Auftreten von mtDNA-Mutationen und der Intensität der ROS-Produktion in Mitochondrien gibt. Der direkte Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern ist noch nicht genau geklärt und ein Schwerpunkt der aktuellen Forschung [168]. Interessanterweise konnte im Gehirn und im Muskel 18 und 24 Monate alter mtNOD-Tiere keine erhöhte ROS-Produktion im Vergleich zu 12 Monate alten Tieren detektiert werden. Dieser Effekt war auch im Lebergewebe in beiden Stämmen zu erkennen. In Übereinstimmung mit den Theorien von Harman und Hekimi [123, 126] stieg die ROS-Produktion der Leber von 3 zu 9 Monate alten Tieren in beiden Stämmen vergleichbar auf ein ähnliches Niveau an. Allerdings blieb in höherem Alter die ROS-Produktion im mtNOD-Stamm auf dem Niveau 9 Monate alter Tiere, während diese im Kontrollstamm mit dem Alter sogar signifikant geringer war. Diese Beobachtungen widersprechen den Theorien von Harman und Hekimi [123, 126]. So scheint der Organismus durchaus zum Teil in der Lage zu

sein, die postulierte unausweichliche Zunahme der ROS-Produktion im Alter zu regulieren und einzugrenzen.

Hekimi geht in seiner Theorie davon aus, dass bei gemäßigter ROS-Produktion im jungen Organismus ROS eher cytoprotektiv als cytotoxisch wirkt. Im höheren Alter hingegen nimmt die ROS-Produktion zu, wodurch deren cytotoxischen Eigenschaften an Bedeutung gewinnen. Entsprechend muss es für die verschiedenen Organe in einem bestimmten Organismus einen Grenzwert der ROS-Konzentration geben, ab dem die cytotoxischen Wirkungen die cytoprotektiven Effekte überlagern [126]. Nach den erhobenen ROS-Daten in dieser Arbeit, könnte dieser Wert in der Leber bei beiden Stämmen im Alter von 9 Monaten erreicht bzw. überschritten worden sein, da es zu diesem Zeitpunkt zu einer verringerten mtDNA-Kopienanzahl einhergehend mit einer verringerten Genexpressionsrate des mitochondrialen Transkriptionsfaktors TFAM gekommen war. Da ROS überwiegend im Mitochondrium erzeugt werden, deuten diese Daten darauf hin, dass die Zellen als Reaktion auf eine toxische oder grenzwertige ROS-Konzentration, den Gehalt an Mitochondrien verringerten, indem sie beschädigte mitochondriale Strukturen degradieren. Eine Degradierung von mtDNA als Reaktion auf erhöhten oxidativen Stress konnte in verschiedenen Zelltypen nachgewiesen werden [169]. Im Alter von 12 Monaten war ein erneuter Anstieg der mitochondrialen mtDNA-Kopienanzahl und der *TFAM*-Genexpressionsrate zu beobachten, ohne dass die ROS-Produktion im Vergleich zu 9 Monate alten Tieren erhöht war. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Leber zu diesem Alterszeitpunkt durch Anpassungen der Metabolismusrate oder der allgemeinen antioxidativen Abwehr dazu in der Lage war, einem mit dem Alter fortlaufenden Anstieg der ROS-Produktion entgegenzuwirken. Es konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene Zelltypen nach Degradierung beschädigter mtDNA und anschließend verringertem oxidativen Stress den Gehalt der mtDNA-Kopienanzahl wieder regenerieren können [169]. Interessanterweise war in 12 Monate alten mtNOD-Tieren sogar ein signifikant erhöhter Wert der mtDNA-Kopienanzahl im Vergleich zu Kontrolltieren des gleichen Alters zu beobachten. Dies könnte Folge der weiterhin konstant hohen ROS-Produktion in 12 Monate alten Tieren dieses Stammes sein. Eine Korrelation der mtDNA-Kopienanzahl und der Intensität des oxidativen Stresses konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden [170-172]. Nach Degradierung beschädigter mtDNA zum 9-Monats-Zeitpunkt, könnte im mtNOD-Stamm zum 12-Monats-Zeitpunkt eine stark erhöhte mtDNA-Syntheserate den weiterhin erhöhten oxidativen Stress kompensieren.

Eine verringerte bzw. gleich bleibende ROS-Produktion im Kontroll- bzw. dem mtNOD-Stamm nach dem 9-Monats-Zeitpunkt (vor Beginn der zweiten Lebenshälfte [10]) ist nach Grundlage der gängigen altersabhängigen ROS-Theorien erstaunlich. Allerdings konnte eine Gegenregulierung der ROS-Produktion zu diesem frühen Lebensabschnitt nur in der Leber, nicht jedoch im Muskel oder dem Gehirn nachgewiesen werden. Eine Ursache dafür könnte sein, dass es sich beim Muskel und beim Gehirn um postmitotisches Gewebe handelt, während Lebergewebe reversibel postmitotisch ist [173]. Dies bedeutet, dass ausdifferenzierte Zellen des Gehirn- und des Muskelgewebes nicht mehr dazu in der Lage sind, sich mitotisch zu teilen. Das Lebergewebe kann sich hingegen unter besonderen Umständen regenerieren, indem Zellen die Fähigkeit der Zellteilung wieder erlangen [174]. Die Bildung neuer Zellen und die Beseitigung alter beschädigter Zellen durch z.B. Apoptose, könnte mit ein Grund dafür sein, dass die Leber in der Lage war, eine stark erhöhte ROS-Produktion im Alter zu vermeiden. Aufgrund dieser fehlenden Regenerationseigenschaften war dies im Muskel und dem Gehirn in der Form nicht zu beobachten.

4.2 Altersabhängige Störungen der mitochondrialen Struktur in der Leber

In beiden Stämmen kam es mit zunehmendem Alter im Lebergewebe zu einem Verlust der homogenen mitochondrialen Netzwerkstruktur. So konnte jeweils ein steigender Anteil akkumulierter Mitochondrien detektiert werden. Es ist anzunehmen, dass in diesen Bereichen der mitochondriale Lebenszyklus aus Teilungs- und Fusionsprozessen gestört gewesen ist und dadurch deren Funktion eingeschränkt war.

Auffällig war, dass diese akkumulierten Strukturen im Lebergewebe des mtNOD-Stammes bereits gehäuft im Alter von 6 Monaten aufgetreten waren. Das mitochondriale Netzwerk der Leber in den Kontrolltieren hingegen wies in diesem Alter noch einen hohen Grad an Homogenität auf. Dies war auch bei anderen konplastischen Mausstämmen, die ebenfalls Punktmutationen im mitochondrialen Genom tragen, der Fall (siehe Anhang, Punkt 6.1). Vermehrt auftretende akkumulierte mitochondriale Strukturen waren in diesen Stämmen erst im Alter von 9 Monaten detektierbar. Demnach waren mitochondriale Alterungserscheinungen im Lebergewebe im Alter von 6 Monaten spezifisch für die Punktmutation in *COX3* im mtNOD-Stamm.

Ein ähnlicher Effekt wurde bei adipösen ob/ob Mäusen gezeigt. Auch hier konnte im Vergleich zu Kontrollmäusen ein Verlust der homogenen mitochondrialen Netzwerkstruktur in Leber- und Fettgewebe detektiert werden [175].

In beiden Stämmen kam es in der Leber im Alter von 12 Monaten zu einem signifikant erhöhten Vorkommen der akkumulierten mitochondrialen Strukturen. Dies könnte Ursache des erhöhten oxidativen Stresses im Alter von 9 Monaten gewesen sein. Des Weiteren war bemerkenswert, dass es in 18 und 24 Monate alten Kontrolltieren anscheinend wieder zu einer Regeneration der homogenen Struktur des mitochondrialen Netzwerks gekommen war. Dies könnte mit der Regenerationsfähigkeit des reversibel postmitotischen Lebergewebes [174] einhergehend mit der verringerten ROS-Produktion in 18 und 24 Monate alten Kontrollmäusen begründet sein. Dies war im mtNOD-Stamm nicht feststellbar und könnte wiederum Ursache der auch im Alter konstant hohen ROS-Produktion dieses Stammes sein. Zusätzlich war auffällig, dass in Hepatozyten 3 und 6 Monate alter Kontrolltiere mitochondriale Loopstrukturen signifikant weniger vorkamen als in Hepatozyten von mtNOD-Tieren des gleichen Alters. Erst im Alter von 9 Monaten war das Vorkommen dieser Mitochondrien in den Kontrolltieren ähnlich dem der mtNOD-Tiere. Es konnte gezeigt werden, dass loopförmige Mitochondrien vermehrt unter Stress entstehen [176] und biochemisch sowie pathophysiologisch von Bedeutung sind [177]. So wird angenommen, dass loopförmige Mitochondrien frühe Marker für zellulären Stress sind [176]. Obwohl diese Struktur von Mitochondrien potentiell reversibel ist [176], konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass die Dynamik dieser Mitochondrien vermindert ist. Dies lässt darauf schließen, dass die Funktion dieser Mitochondrien beeinträchtigt ist. Die Tatsache, dass diese Strukturen schon vermehrt in Hepatozyten junger mtNOD-Tiere vorkamen, könnte daher ebenfalls ein Anzeichen dafür sein, dass Alterungserscheinungen in der Leber des mtNOD-Stammes früher aufgetreten sind.

4.3 Genexpression der COX-Untereinheiten in Hepatozyten

Die COX der Säugetiere setzt sich aus 14 Untereinheiten zusammen [43]. Die mitochondrial kodierten Untereinheiten COX1, COX2 und COX3 bilden den katalytischen Kern des Enzyms, während die restlichen nukleär kodierten Enzyme für die Stabilität und die Dimerisation des Enzymkomplexes von Bedeutung sind [160].

Die verringerte Expression der COX-Untereinheiten des katalytischen Kerns in Kontrolltieren zum 9-Monats-Zeitpunkt sollte eine verringerte Rate der oxidativen Phosphorylierung in den Zellen zur Folge haben [45]. Auslöser hierfür könnte der erhöhte oxidative Stress zu diesem Zeitpunkt sein. Interessanterweise war eine signifikante Abnahme von *COX1* und *COX3* im mtNOD-Stamm im Alter von 9 Monaten nicht zu beobachten, obwohl auch in diesem Stamm

ein erhöhter oxidativer Stress zum Zeitpunkt von 9 Monaten detektiert worden war. Diese Daten deuten entsprechend daraufhin, dass es im mtNOD-Stamm nicht zu einer von der ROS-Produktion abhängigen Verringerung der oxidativen Phosphorylierung im Alter von 9 Monaten gekommen war.

In 12 Monate alten Kontrolltieren nahm die *COX1*- und *COX3*-Genexpressionsrate wieder zu. Zu diesem Zeitpunkt waren auch die mtDNA-Kopienanzahl und die Genexpressionsrate von *TFAM* im Vergleich zu 9 Monate alten Tieren erhöht. Des Weiteren war der oxidative Stress zu diesem Zeitpunkt verringert. Dies deutet daraufhin, dass durch eine Anpassung von diversen zellulären Verteidigungsmechanismen auf einen erhöhten oxidativen Stress im Alter von 9 Monaten, der zelluläre mitochondriale Gehalt und die Synthese von Atmungskettenkomplexen wieder normalisiert werden konnte.

Interessanterweise war das Muster der Genexpression der nukleär kodierten Untereinheit COX6a1 in den Tieren beider Stämme ähnlich dem ermittelten *COX3*-Genexpressionsmuster. So war im Gegensatz zu Kontrolltieren ein erniedrigter *COX6a1*-Expressionswert in 9 Monate alten mtNOD-Tieren nicht zu beobachten. Da diese Untereinheit in unmittelbarer Umgebung zu COX3 lokalisiert ist, könnte dies bedeuten, dass Stabilität und Aktivität des katalytischen Kerns besonders von dieser Untereinheit abhängig sind. Eine Abhängigkeit der Expressionsraten von *COX3* und *COX6a1* wären demnach zu erwarten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein Defekt von COX6a1 zu einer Reduktion der COX-Aktivität und zu einer verringerten ATP-Synthese führt [178]. Da im mtNOD-Stamm neben den Untereinheiten des katalytischen Kerns der COX auch *COX6a1* in 9 Monate alten Tieren signifikant stärker exprimiert wurde als im Kontrollstamm, deutet auch dies auf eine erhöhte Metabolismusrate zu diesem Zeitpunkt hin.

Interessanterweise war das altersabhängige *COX6b1*-Genexpressionsmuster in beiden Stämmen proportional zum *TFAM*-Genexpressionsmuster. Dies könnte bedeuten, dass auch nukleär kodierte Gene von TFAM reguliert werden können. Es konnte bereits gezeigt werden, dass TFAM auch im Zellkern lokalisiert sein kann und dort die Genexpression nukleärer Gene reguliert [179]. COX6b1 ist wichtig, um die dimere Struktur der COX zu stabilisieren [162]. Die *COX6b1*-Expressionsrate war im Gegensatz zu den Untereinheiten mit katalytischer Funktion in 9 Monate alten mtNOD-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht erhöht. Entsprechend schien im mtNOD-Stamm kurzfristig zum 9-Monats-Zeitpunkt, bei einsetzendem erhöhtem oxidativen Stress, in erster Linie die Expression katalytisch aktiver Strukturen der COX von besonderer Bedeutung zu sein.

Auch die *COX5a*-Genexpressionsrate war in 9 Monate alten Kontrolltieren im mtNOD-Stamm im Vergleich zum Kontrollstamm nicht erhöht. Generell ist das Expressionsmuster von *COX5a* in beiden Stämmen über das Alter proportional zueinander. Folglich schien die Mutation in *COX3* keinen Einfluss auf die Expression dieser peripher im Komplex lokalisierten Untereinheit zu haben. Auffällig war die relativ hohe *COX5a*-Expressionsrate im Alter von 3 Monate alten Tieren in Relation zu den eher niedrigen Expressionswerten von *TFAM* zu diesem Zeitpunkt. *COX5a* ist eine regulatorische Untereinheit, die durch Bindung von Schilddrüsenhormonen die Inhibierung von COX durch ATP verhindert [161]. Da im jungen Organismus die Belastung mit oxidativem Stress in der Regel gering und der allgemeine Energiebedarf eher hoch ist [180], sollte auch eine entsprechende Regulierung von COX durch ATP im Vergleich zu älteren Tieren geringere Bedeutung haben. Dies würde die relativ hohe Genexpression von *COX5a* zum Ende der Wachstums- und Entwicklungsphase erklären.

4.4 Genexpressionsraten antioxidativer Enzyme in Hepatozyten

Generell war das Genexpressionsmuster der cytosolischen antioxidativen Enzyme untereinander und in beiden Stämmen ähnlich. Das Genexpressionsmuster des mitochondrialen antioxidativen Enzyms *SOD2* unterschied sich vom Muster der cytosolischen antioxidativen Enzyme und war auch in den beiden Stämmen spezifisch.

Im Kontrollstamm war der deutlich signifikante Maximalwert der Genexpressionsrate von *SOD2* in 9 Monate alten Tieren auffällig. Dieser ist umso bemerkenswerter, als dass zu diesem Zeitpunkt die mtDNA-Kopienanzahl verringert war. Interessanterweise war zu diesem Alterszeitpunkt auch die ROS-Produktion in der Leber der Kontrolltieren maximal erhöht. Mit verringerter ROS-Produktion in 12 Monate alten Kontrolltieren nahm auch die Expressionsrate von *SOD2* ab. Dies deutet daraufhin, dass diese in kurzer Reaktionszeit induzierbar ist und in Abhängigkeit zum ROS-Gehalt der Zelle reguliert wird. In anderen Studien wurde bereits postuliert, dass *SOD2* im Vergleich zu *SOD1* schneller regulierbar ist [181]. Im mtNOD-Stamm kam es zu einem kontinuierlichen und altersabhängigen Anstieg der Expressionsrate von *SOD2*. Entsprechend war diese in 12 Monate alten mtNOD-Tieren signifikant höher als in Kontrolltieren des gleichen Alters. Die hohe *SOD2*-Genexpressionsrate in 12 Monate alten mtNOD-Tieren ist Folge der im Vergleich zum Kontrollstamm hohen ROS-Produktion im Lebergewebe zu diesem Zeitpunkt.

Eine direkte Anpassung der *SOD2*-Genexpressionsrate an den ROS-Gehalt in der Zelle sollte von großer Bedeutung für den Organismus sein, da ein Großteil der mitochondrial entstehenden ROS in Form von Superoxidradikalen in die Matrix abgegeben wird. Entsprechend sind mitochondriale Strukturen bei einsetzendem erhöhtem oxidativen Stress besonders gefährdet. Folglich wurde bei *SOD2* Knockout Mäusen ein erhöhter Grad an oxidativem Stress und erhöhte neonatale und perinatale Sterblichkeit ermittelt [182, 183].

Da die Expressionsrate von *SOD1* durch das Enzym DJ1 reguliert wird [90], war auch ein ähnliches altersabhängiges Expressionsmuster dieser beiden antioxidativen Enzyme zu erwarten. Die Expressionsrate dieser Enzyme war, wie bei der Katalase, in 12 Monate alten Tieren beider Stämme gegenüber dem 6- und 9-Monats-Zeitpunkt signifikant erhöht. Dies deutet daraufhin, dass diese Enzyme nicht direkt durch einsetzenden oxidativen Stress induziert werden und sich die Expressionsraten erst zeitversetzt anpassen. Auch *SOD1* ist für die antioxidative Verteidigung von großer Bedeutung. So wurde auch in *SOD1* Knockout Mäusen ein erhöhter Grad an oxidativem Stress und eine Verringerung der Lebensdauer um 30 % festgestellt [184]. Eine erhöhte Sterblichkeit von Neugeborenen war jedoch nicht feststellbar.

Überraschend war die hohe Genexpressionsrate aller cytosolischen antioxidativen Enzyme zum 3-Monats-Zeitpunkt in beiden Stämmen, da zu diesem Zeitpunkt die ROS-Produktion in der Leber minimal war. Gegebenenfalls ist eine vorbeugend erhöhte Konzentration an cytosolischen antioxidativen Enzymen für den heranwachsenden Organismus insofern von Bedeutung, als dass er so vor umweltbedingtem spontan einsetzendem oxidativem Stress besser geschützt sein könnte.

4.5 Mitochondrialer Metabolismus in Hepatozyten

Um die altersabhängige Rate des mitochondrialen Metabolismus in isolierten Hepatozyten der beiden Stämme zu analysieren, wurden der ATP- und ADP-Gehalt, die COX-Aktivität und das MMP pro Zelle bestimmt. Des Weiteren wurde auf Geneexpressionsebene das altersabhängige Muster von *UCP2* und *PCX* bestimmt.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten deuten darauf hin, dass die basale Metabolismusrate in der Leber in jungen Kontrolltieren höher ist als in jungen mtNOD-Tieren. So ist in diesen Tieren das MMP, der ATP-Gehalt, die COX-Aktivität und die Genexpressionsrate der Pyruvatcarboxylase in Hepatozyten signifikant erhöht. Der ROS-Gehalt im Lebergewebe hingegen, war in jungen Tieren beider Stämme auf ähnlich niedrigem Niveau. Da die

Intensität der ROS-Generierung von der Intensität der Metabolismusrate abhängig ist [91], deutet die niedrige Metabolismusrate in jungen mtNOD-Tieren darauf hin, dass die Mutation in *COX3* die ROS Produktion auch schon in der Leber junger Tiere beeinflusst hat.

Sowohl das MMP, die COX-Aktivität und die *PCX*-Genexpressionsrate waren in Hepatozyten 12 Monate alter Kontrolltiere im Vergleich zu jungen Tieren signifikant erniedrigt, was auf eine verringerte Metabolismusrate in der Leber im Alter hinweist. Diese Vermutung wird durch den gemessenen Anstieg der *UCP2*-Genexpressionsrate gestützt. Eine signifikante Abnahme des ATP-Gehalts in Hepatozyten war schon nach 6 Monaten zu beobachten. Danach stieg dieser im Alter wieder tendenziell an. Allerdings kam es in den Hepatozyten älterer Tiere zu einer generellen Erniedrigung des Adeninnukleotidpools, so dass die ATP/ADP-Ratio in 12 Monate alten Tieren signifikant angestiegen war. Eine erhöhte ATP/ADP-Ratio in der Zelle wiederum führt zu einer verstärkten Inhibierung der COX [161]. Es ist anzunehmen, dass die Leber der Kontrollmäuse aufgrund des erhöhten oxidativen Stress im Alter von 9 Monaten die basale Metabolismusrate herunterreguliert hatte, um einem weiteren Anstieg der ROS-Produktion im Alter entgegenzuwirken. Diese Strategie sollte demnach eine Ursache dafür sein, weswegen eine verringerte ROS-Produktion in der Leber älterer Tiere detektiert werden konnte. Es konnte bereits außerdem gezeigt werden, dass bei oxidativem Stress die NAD^+ -Kinase vermehrt und die NADPase vermindert synthetisiert wird. Folglich steigt die NADP^+ -Konzentration in der Zelle an, während die NAD^+ -Konzentration verringert ist. Dies wiederum hat eine verringerte Metabolismusrate und eine effektivere oxidative Verteidigung in der Zelle zur Folge [185].

Bemerkenswerterweise war in Hepatozyten des mtNOD-Stamms der gegenteilige Effekt bezüglich der Metabolismusrate im Alter zu beobachten. Sowohl das MMP als auch COX-Aktivität und die *PCX*-Genexpressionsrate waren in 12 Monate alten Tieren signifikant erhöht. Des Weiteren kam es zu einer Erhöhung der ATP-Produktion, ohne dass die ATP/ADP-Ratio erhöht war. Auch eine Heraufregulierung der *UCP2*-Genexpressionsrate war in den Hepatozyten des mtNOD-Stammes nicht zu beobachten. Die basale Metabolismusrate war demnach in Hepatozyten 12 Monate alter mtNOD-Tiere sowohl gegenüber jungen mtNOD-Tieren als auch gegenüber 12 Monate alten Kontrolltieren erhöht. Auch die Genexpressionsdaten der katalytischen Untereinheiten zum 9-Monats-Zeitpunkt im mtNOD-Stamm (siehe Punkt 4.3) deuten auf eine erhöhte Metabolismusrate im Vergleich zum Kontrollstamm hin. Entsprechend reagierte die Leber dieser Tiere nicht mit einem verringerten Stoffwechsel auf den erhöhten oxidativen Stress nach 9 Monaten. Dies könnte

Ursache dafür sein, dass eine Verringerung der ROS-Produktion in der Leber des mtNOD-Stammes im Alter nicht feststellbar war. Interessanterweise konnte in seneszenten humanen Endothelzellen der Vena umbilicalis (HUVECs) ebenfalls keine Reduktion des MMP in Reaktion auf oxidativen Stress festgestellt werden [186].

4.6 Mitochondriale Teilungs- und Fusionsprozesse

Der mittlere Elongationsgrad von Mitochondrien in Hepatozyten der beiden Tierstämme zu unterschiedlichen Alterszeitpunkten wurde sowohl morphologisch als auch auf Genexpressionsebene analysiert.

Die morphologische Analyse des altersabhängigen mitochondrialen Elongationsgrad in Hepatozyten des Kontrollstammes ergab, dass es zu einer deutlichen signifikanten Fragmentierung der Mitochondrien im Alter von 9 Monaten kam. Im mtNOD-Stamm hingegen nahm der mitochondriale Elongationsgrad im Alter von 9 und 12 Monaten kontinuierlich zu. Zum 9-Monats-Zeitpunkt kam es entsprechend in den beiden Stämmen zu einer entgegengesetzten Veränderung der Struktur der Mitochondrien bezüglich des Elongationsgrad. Auffällig ist, dass zu diesem Zeitpunkt in beiden Stämmen auch die Intensität des oxidativen Stresses den Maximalwert erreicht hatte. Entsprechend könnte eine Veränderung der mitochondrialen Struktur in den Hepatozyten beider Stämme eine Reaktion auf die erhöhte ROS-Produktion im Gewebe sein.

Sowohl vermehrte mitochondriale Teilungsprozesse als auch vermehrte mitochondriale Fusionsprozesse können eine Schutzfunktion gegenüber erhöhten oxidativen Stress darstellen [104]. Bei einer erhöhten Teilungsrate können defekte Strukturen auf einzelne fragmentierte Mitochondrien übertragen werden, welche dann via Mitophagie beseitigt werden. Bei einer erhöhten Fusionsrate können defekte Strukturen in den dann entstehenden elongierten Mitochondrien verdünnt werden [104]. Anscheinend unterscheiden sich die Verteidigungsmechanismen der beiden Tierstämme auf den einsetzenden oxidativen Stress nach 9 Monaten bezüglich der mitochondrialen Teilungs- und Fusionsprozesse. Demnach reagiert der Kontrollstamm auf erhöhten oxidativen Stress in der Leber, indem durch verstärkte mitochondriale Fragmentierung vermehrt defekte mitochondriale Strukturen durch Mitophagie beseitigt werden. Im Gegensatz dazu kommt es im mtNOD-Stamm überwiegend zu einer Verdünnung defekter mitochondrialer Strukturen, indem es vermehrt zu mitochondrialen Fusionsprozessen kommt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Reduktion des MMP mitochondriale Fusionsprozesse beeinträchtigt [187]. Dies erklärt, dass mit zunehmendem mitochondrialen Elongationsgrad in den Hepatozyten des mtNOD-Stammes in den Hepatozyten auch das mitochondriale Membranpotenzial angestiegen war. Weiterhin könnte dies Ursache dafür sein, dass die *UCP2*-Expressionsrate im Alter im mtNOD-Stamm nicht erhöht war, obwohl die entkoppelnde Wirkung dieses Proteins eine wichtige Schutzfunktion im Organismus bei einsetzenden oxidativen Stress darstellt [100, 101]. Außerdem erklärt dies die erhöhte *PCX*-Genexpressionsrate und die erhöhte COX-Aktivität in 12 Monate alten mtNOD-Mäusen.

Aufgrund der morphologischen Daten der altersabhängigen mitochondrialen Struktur, war erwartet worden, dass in Hepatozyten junger Kontrolltiere verhältnismäßig mehr Teilungsproteine und in alten Tieren mehr Fusionsproteine exprimiert werden. In den Hepatozyten des mtNOD-Stammes war entsprechend der gegenteilige Effekt erwartet worden. Werden die morphologischen mitochondrialen Daten der Hepatozyten im Kontrollstamm und das Verhältnis der Expressionsdaten von Fusions- zu Teilungsproteinen miteinander verglichen, ist ein übereinstimmendes Muster zu beobachten. Im mtNOD-Stamm stimmen die morphologischen Daten mit den Genexpressionsdaten zu den Zeitpunkten 3 und 12 Monaten miteinander überein. Im mtNOD-Stamm war allerdings auffällig, dass es in Hepatozyten 6 Monate alter Tiere mit niedrigem mitochondrialen Elongationsgrad zu einer Heraufregulierung der Expressionsrate von Fusionsproteinen kam. In Hepatozyten 9 Monate alter Tiere hingegen waren die Teilungsproteine herauf- und die Fusionsproteine herunterreguliert, obwohl ein erhöhter mitochondrialer Elongationsgrad detektiert worden war. Dieser gegenläufige Effekt kann mit dem MMP der Hepatozyten erklärt werden. So waren bereits in Hepatozyten 6 Monate alter mtNOD-Mäuse Defekte der mitochondrialen Netzwerkstruktur im Lebergewebe detektiert worden (siehe Punkt 4.2). Dies könnte zur Folge gehabt haben, dass die Genexpressionsrate der Fusionsproteine heraufreguliert wurde, um defekte mitochondriale Strukturen durch vermehrt einsetzende mitochondriale Fusionsprozesse zu verdünnen. Aufgrund der zu diesem Zeitpunkt geringen Metabolismusrate in diesem Stamm, war auch das MMP gering. Dies wiederum schränkt die Effektivität der Fusionsprozesse ein, da die Fusionsproteine trotz erhöhter Expression nur vermindert an die Mitochondrien binden [187]. So war auf morphologischer Ebene noch kein erhöhter Elongationsgrad in den Hepatozyten feststellbar. Die auffällige niedrige *UCP2*-Expressionsrate in 6 Monate alten mtNOD-Mäusen deutet ebenfalls darauf hin, dass der Organismus zu diesem Zeitpunkt bestrebt war, das MMP in den Hepatozyten zu erhöhen. 3

Monate später war auf morphologischer Ebene ein erhöhter mitochondrialer Elongationsgrad einhergehend mit dem dann auch erhöhten MMP zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt war allerdings die Expressionsrate mitochondrialer Teilungsproteine im Verhältnis zu den Fusionsproteinen erhöht. Dies könnte bedeuten, dass entgegen der Interpretation der reinen morphologischen Daten, wohl auch in diesem Stamm eine erhöhte Mitophagie bei oxidativem Stress von Bedeutung war. Entsprechend wäre auch der niedrige Wert der mtDNA-Kopienanzahl zu diesem Zeitpunkt zu erklären. Allerdings wirkte das erhöhte MMP einer verstärkten mitochondrialen Fragmentierung, wie sie auf morphologischer Ebene im Kontrollstamm zu beobachten war, entgegen. Dies könnte gleichzeitig eine wichtige Schutzfunktion in den Hepatozyten des mtNOD-Stammes sein. Ansonsten könnte eine hohe Mitophagierate im mtNOD-Stamm, aufgrund der im Vergleich zum Kontrollstamm vermehrt auftretenden beschädigten mitochondrialen Strukturen (siehe Punkt 4.2), die mitochondriale Funktion in den Hepatozyten 9 Monate alter Tiere gefährden. In seneszenten HUVECs konnten ebenfalls Schutzfunktionen gegenüber durch ROS induzierte mitochondriale Fragmentierung und verstärkte Mitophagie beschrieben werden [186].

Zusammenfassend traten im Alter von 6 Monaten in den Hepatozyten des mtNOD-Stammes verstärkt mitochondriale Fusionsprozesse auf, um vermehrt auftretende defekte Strukturen im mitochondrialen Netzwerk zu verdünnen. Im Alter von 9 Monaten kam es aufgrund des erhöhten oxidativen Stresses zu einer angepassten Zunahme mitochondrialer Teilungsproteine in beiden Stämmen, um defekte Strukturen via Mitophagie zu beseitigen. Aufgrund des erhöhten MMP waren Hepatozyten des mtNOD-Stammes vor verstärkt einsetzender Fragmentierung und vor einer zu hohen Mitophagierate geschützt.

4.7 Mitophagie und Apoptose

Bedeutende Enzyme der Mitophagie sind PINK1 und PARKIN. PINK1 akkumuliert an der MAM defekter Mitochondrien mit geringem MMP und rekrutiert PARKIN, welches Mitophagie einleitet [106].

In beiden Stämmen war eine signifikante Heraufregulierung der *PARK2*-Genexpressionsrate (kodiert für das Enzym PARKIN) im Alter von 9 Monaten auffällig, während die *PINK1*-Genexpressionsrate auf konstantem Niveau verblieb. Die erhöhte Expressionsrate von *PARK2* deutet auf eine erhöhte Mitophagierate in beiden Stämmen zum Alterszeitpunkt 9 Monate hin. Diese Annahme entspricht der These in Punkt 4.6, nach der erhöhte Mitophagie in beiden Stämmen zum 9-Monats-Zeitpunkt auf Grund der verhältnismäßig hohen Expressionsrate

mitochondrialer Teilungsproteine eingeleitet worden war. Des Weiteren erklärt eine erhöhte Mitophagierate auch die niedrige *TFAM*-Expressionsrate und die niedrige mtDNA-Kopienanzahl zu diesem Zeitpunkt in den Hepatozyten beider Stämme. In Neuronen von Mäusen konnte bereits ein entgegengesetzter Effekt gezeigt werden. So hatte hier ein Knockout von *PARK2* die Elimination beschädigter Mitochondrien in Neuronen von Mäusen eingeschränkt [188].

Auffällig im Kontrollstamm war eine anschließende signifikante Herunterregulierung von *PINK1* und *PARK2* in 12 Monate alten Mäusen. Dies deutet darauf hin, dass in 9 Monate alten Kontrollmäusen defekte mitochondriale Strukturen effektiv durch Mitophagie beseitigt worden waren. Entsprechend war der Anteil defekter Strukturen in 12 Monate alten Mäusen erniedrigt, was die verringerte ROS-Produktion in der Leber zu diesem Zeitpunkt erklären würde. Aufgrund der erhöhten *UCP2* Expression zum 12-Monats-Zeitpunkt in den Hepatozyten des Kontrollstammes kam es auch in prinzipiell intakten Mitochondrien zu einem erniedrigten MMP. Daher bestand die Gefahr, dass *PINK1* auch in diesen Mitochondrien an der äußeren mitochondrialen Membran akkumulieren und so Mitophagie intakter Mitochondrien einleiten würde. So konnte bereits gezeigt werden, dass wenn Zellen mit dem Protonophor Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP), einem chemischen Entkoppler der mitochondrialen Atmungskette, behandelt wurden, die Intensität der Mitophagie angestiegen war [106, 189]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass bei einer Überexpression von *PINK1* auch intakte Mitochondrien mit nicht verringertem MMP durch Mitophagie beseitigt werden können [190]. Eine Herunterregulierung von *PINK1* und *PARK2* war demnach eine wichtige Schutzfunktion in den Hepatozyten dieses Stammes zum 12-Monats-Zeitpunkt. Im mtNOD-Stamm verblieb die Expressionsrate von *PINK1* und *PARK2* in Hepatozyten 12 Monate alter Tiere auf dem Niveau 9 Monate alter Tiere. Dies ist mit der nicht erhöhten *UCP2*-Expressionsrate und des allgemein erhöhten MMP in Hepatozyten 12 Monate alter mtNOD-Tiere zu erklären. So bestand in diesem Stamm nicht die Gefahr, aufgrund der hohen *PINK1*- und *PARK2*-Genexpressionsraten, intakte Mitochondrien zu eliminieren. Eine gleichbleibend hohe *PINK1*-Expressionsrate in 12 Monate alten mtNOD-Mäusen könnte zusätzlich abhängig von der erhöhten *TRAP1*-Genexpressionsrate in Hepatozyten zu diesem Zeitpunkt gewesen sein. So aktiviert *PINK1* durch Phosphorylierung das Chaperon *TRAP1* [109], welches Atmungskettenkomplexe in der MIM stabilisiert. Dadurch wiederum verhindert es eine verstärkte Freisetzung von Cytochrom *c*, was intrinsische Apoptose einleiten könnte. Weiterhin war interessant, dass die

Expression des mitochondrialen Teilungsprotein *DNM1L* in Hepatozyten 12 Monate alter mtNOD-Mäuse herunterreguliert war. Diesem Protein wird bei der Einleitung der Apoptose eine große Bedeutung zugeschrieben [191]. Aufgrund der hohen *PINK1*- und *TRAP1*-Genexpressionsraten und der niedrigen Expressionsrate von *DNM1L*, kam es in der Leber 12 Monate alter mtNOD-Mäuse zu einem erhöhten apoptotischen Schutz. Verglichen mit dem Kontrollstamm deutet dies auf ein hohes Stressniveau in der Leber der mtNOD-Tiere zu diesem Zeitpunkt hin. Ein weiterer Hinweis, dass das Stressniveau in den mtNOD-Tieren zu diesem Zeitpunkt erhöht war, ist die signifikant erhöhte mtDNA-Kopienanzahl, welche als Adaption an erhöhten Stress verstanden werden kann [192].

Ein erhöhter apoptotischer Schutz scheint in Hepatozyten 12 Monate alter Kontrollmäuse nicht notwendig zu sein. Neben der erniedrigten *PINK1*-Expressionsrate wurde weder *TRAP1* verstärkt noch *DNM1L* vermindert exprimiert. Auch war die mtDNA-Kopienanzahl auf dem Niveau 6 Monate alter Tiere. Folglich war das Stressniveau in Hepatozyten 12 Monate alter Kontrollmäuse geringer als in 12 Monate alten mtNOD-Mäusen.

4.8 Bewertung des physiologischen Alters von Hepatozyten

Ein erhöhter mitochondrialer Elongationsgrad wurde bisher in vielen verschiedenen seneszenten Zelltypen festgestellt. So wurde dies z.B. in menschlichen Endothelzellen [193] oder auch in Chang-Zellen [194] einer Hepatozyten-Zelllinie gezeigt. Ursache hierfür soll ein verstärkter Schutz gegen apoptotische Stimuli sein [195, 196].

Auch Mai et al. zeigten, dass in gealterten humanen Endothelzellen der Vena umbilicalis (HUVECs) ein erhöhter mitochondrialer Elongationsgrad auftrat [186]. Ziel dieser Arbeitsgruppe war es, zu analysieren, wie junge und gealterte HUVECs auf oxidativen Stress reagieren. Oxidativer Stress wurde in dieser Studie künstlich durch Strahlung erzeugt. Es konnte festgestellt werden, dass es in jungen HUVECs anschließend zu einer verstärkten Fragmentierung und zu einer Verringerung des MMP in den Mitochondrien kam. Des Weiteren wurde eine Heraufregulierung der Expressionsraten von *DNM1L* und von *FIS1* festgestellt, während *PINK1* herunterreguliert war. In seneszenten HUVECs hingegen kam es weder zu erhöhter Fragmentierung noch zu einer Verringerung des MMP der Mitochondrien. Des Weiteren wurde in diesen Zellen eine Herunterregulierung von *DNM1L* und *FIS1* festgestellt, während *PINK1* heraufreguliert war.

Auffällig war, dass Hepatozyten des Kontrollstammes ähnlich auf natürlich bedingten altersabhängigen oxidativen Stress reagierten wie die jungen HUVECs auf künstlich

erzeugten oxidativen Stress. Neben einer erhöhten Fragmentierung der Mitochondrien und einem reduzierten MMP war auch *PINK1* im Alter signifikant herunterreguliert. *FIS1* war ebenfalls nach 9 Monaten heraufreguliert, wobei in den Hepatozyten dieser Studie die erhöhte Fragmentierung wohl vor allem durch eine Herunterregulierung der mitochondrialen Fusionsproteine reguliert wurde. Interessanterweise reagierten die Hepatozyten des mtNOD-Stammes auf den oxidativen Stress eher wie die seneszenten HUVECs. So war in diesen Zellen, wie bereits erläutert, eine erhöhte mitochondriale Elongation und eine erhöhtes MMP feststellbar, während *PINK1* nach dem einsetzenden oxidativen Stress im Alter nicht herunterreguliert war und es zu einer Heraufregulierung der mitochondrialen Fusionsproteine kam. Des Weiteren war *DNM1L* deutlich herunterreguliert.

Die Daten lassen den Schluss zu, dass Alterungsprozesse in den Hepatozyten des mtNOD-Stammes früher einsetzen als in den Hepatozyten des Kontrollstammes. Diese These wiederum entspricht der Diskussion in Punkt 4.2, nach welcher Alterseffekte des mitochondrialen Netzwerkes und der mitochondrialen Struktur in den Hepatozyten des mtNOD-Stammes früher eintreten. Außerdem konnte im Gegensatz zum Kontrollstamm ein verstärkter Schutz gegen Apoptose in Hepatozyten 12 Monate alter mtNOD-Mäuse nachgewiesen werden (siehe Punkt 4.7).

4.9 Cytosolischer und mitochondrialer Ca^{2+} -Einstrom nach Glukose-Stimulus

Wenn Mitochondrien und das ER im Cytoplasma der Zelle nahe beieinander liegen, können Proteine der Membranen dieser Organellen miteinander interagieren [197]. Dabei können spezielle Kontaktstellen zwischen den Organellen entstehen, wobei diese allerdings nicht direkt miteinander fusionieren [198]. Interessanterweise wird MFN2 eine bedeutende Funktion bei der Bildung dieser Kontaktstellen zugeschrieben. So ist MFN2 auch auf der Membran des ER lokalisiert und kann homo- und heterotypische Interaktionen mit mitochondrial lokalisiertem MFN2 und MFN1 eingehen [199]. Dies könnte auch den mitochondrialen Ca^{2+} -Einstrom beeinflussen, der für den Metabolismus der Mitochondrien bedeutsam ist.

Zu den gemessenen Alterszeitpunkten kam es jeweils in den Hepatozyten beider Stämme nach Glukosezufuhr zu einem cytosolischen und mitochondrialen Ca^{2+} -Einstrom aus dem ER. Der Ca^{2+} -Einstrom wurde in den Hepatozyten nach der Phase des Nährstoffmangels durch die Zufuhr von Glukose induziert. Dieser durch Glukose induzierte Ca^{2+} -Einstrom ist typisch für hungernde eukaryotischen Zellen [200]. Die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration in Cytosol und

Matrix wiederum stimuliert die Zellatmung auf verschiedenen Ebenen. So konnte die Einstellung einer physiologisch adäquaten Metabolismusrate beschleunigt werden [135].

Auffällig war der signifikant erhöhte cytosolische Ca^{2+} -Einstrom in den Hepatozyten 12 Monate alter Kontrollmäuse im Vergleich zu jüngeren Mäusen. Ursache hierfür könnte die verringerte Genexpressionsrate von *MICU1* und *SLC25a23* im Alter sein. Eine niedrige Genexpression der regulatorischen Untereinheiten des MCU sollten den Transport von Ca^{2+} -Ionen in die Matrix der Mitochondrien negativ beeinträchtigen. Des Weiteren war zusätzlich die Genexpressionsrate von *VDAC1* in Hepatozyten 12 Monate alter Kontrollmäuse verringert. Durch diesen Kanal können Ca^{2+} -Ionen, aber auch andere Metaboliten der Zellatmung, die äußere mitochondriale Membran passieren und aus dem Cytosol in den Intermembranraum gelangen [151]. Eine Herunterregulierung der *VDAC1* Genexpression kann mit der verringerten basalen Metabolismusrate im Alter begründet werden. So sollten bei verringerter Zellatmung auch Austauschprozesse von Metaboliten zwischen Cytosol und Matrix abnehmen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die VDAC1-Synthese in verschiedenen Krebszellen mit erhöhten Energiebedarf heraufreguliert ist [201, 202], während eine Herunterregulierung der *VDAC1*-Geneexpression eine verringerte ATP-Synthese zur Folge hat [203]. Aufgrund der verringerten Genexpression bzw. der verminderten Aktivität mitochondrialer Kanäle der äußeren und der inneren mitochondrialen Membran nimmt in den Mitochondrien die Permeabilität für Calcium im Alter insgesamt ab. Daher war auch der mitochondriale Ca^{2+} -Einstrom in den Hepatozyten der Kontrollmäuse im Alter weniger stark als der cytosolische Ca^{2+} -Einstrom. Der erhöhte cytosolische Ca^{2+} -Einstrom im Alter könnte entsprechend die verminderte mitochondriale Permeabilität für Ca^{2+} -Ionen kompensieren.

Der tendenziell leicht erhöhte mitochondriale Ca^{2+} -Einstrom in Hepatozyten 12 Monate alter Kontrollmäuse könnte Ursache der altersbedingten geringeren Ausstattung an Enzymen des Citratzyklus sein. Dieser Annahme entspricht die geringe *PCX*-Genexpressionsrate in diesem Alter. Für Zellen mit geringer Ausstattung an Enzymen des Energiestoffwechsels sollte ein durch Calcium stimulierender Effekt der Zellatmung bei Glukosezufuhr, nach einer längeren Phase des Nährstoffmangels, von besonderer Bedeutung sein. So könnte ein geringer zellulärer Gehalt dieser Enzyme über deren erhöhte Aktivität kompensiert werden [133, 134].

Interessanterweise wird nach aktuellen Forschungsergebnissen eine erhöhte Genexpression von *SLC25a23* nicht nur mit einer erhöhten Durchlässigkeit des MCU für Calcium, sondern auch mit einer erhöhte ROS-Produktion in Verbindung gebracht [155]. Aufgrund dessen war eine Herunterregulierung von *SLC25a23* in Hepatozyten 12 Monate alter Tiere eine

zusätzliche Schutzfunktion auf den erhöhten oxidativen Stress in 9 Monate alten Tieren. So könnte auch diese Anpassung ein Grund für die reduzierte ROS-Produktion in Hepatozyten 12 Monate alter Kontrolltiere sein.

Zusammengefasst veränderte sich in Hepatozyten des Kontrollstammes die Calciumhomöostase im Alter aufgrund einer verringerten basalen Metabolismusrate. Die verringerte mitochondriale Permeabilität für Ca^{2+} -Ionen konnte durch eine erhöhte Freisetzung von Calcium aus dem ER kompensiert werden. Eine Herunterregulierung von *SLC25a23* war u.a. Ursache der moderaten ROS-Generierung in der Leber älterer Kontrolltiere.

Im Gegensatz zu den Hepatozyten des Kontrollstammes war der cytosolische Ca^{2+} -Einstrom nach Glukosezufuhr in 12 Monate alten mtNOD-Mäusen im Vergleich zu 3 Monate alten Mäusen nicht erhöht. Ursache hierfür könnte die zunehmende Metabolismusrate in Hepatozyten der mtNOD-Mäuse mit fortschreitendem Alter gewesen sein. So gilt für diesen Stamm, dass aufgrund der erhöhten Konzentration an metabolisch bedeutenden Enzymen eine durch Calcium bedingte Aktivitätserhöhung nach Nährstoffmangel weniger von Bedeutung war. Außerdem könnten zu hohe cytosolische bzw. mitochondriale Ca^{2+} -Konzentrationen aufgrund des generell erhöhten Stresslevels im Alter (siehe Punkt 4.7 und 4.8) intrinsische Apoptose einleiten [144].

Auffällig war die Zunahme der *MCU*-, der *MICU1*- sowie der *SLC25a23*-Genexpressionsraten in Hepatozyten 9 und 12 Monate alter mtNOD-Tiere, obwohl die mitochondriale Durchlässigkeit für Calcium im Alter anscheinend nicht erhöht war. Ursache hierfür könnten verstärkt vorkommende mitochondriale Defekte im Alter sein. Die erhöhte Genexpressionsrate von *SLC25a23* sollte außerdem ein Grund dafür sein, weshalb in der Leber des mtNOD-Stammes ab einem Alter von 12 Monaten im Gegensatz zum Kontrollstamm keine verringerte ROS-Produktion detektiert werden konnte [155].

Zusammengefasst verringerte sich in gehungerten Hepatozyten des mtNOD-Stammes im Alter die Intensität des cytosolischen und des mitochondrialen Calciumeinstroms. Dies war Ursache der erhöhten basalen Metabolismusrate in Hepatozyten älterer Tiere. Eine zunehmende *MCU*-Genexpressionsrate samt regulatorischer Untereinheiten erhöhte nicht die mitochondriale Permeabilität. Dies deutet auf generelle Dysfunktionen an der mitochondrialen Doppelmembran hin, die auch die Interaktion mit dem ER beeinflussen könnte. Die erhöhte Genexpressionsrate von *SLC25a23* scheint mit Ursache für eine konstant hohe ROS-Produktion in Hepatozyten älterer Tiere zu sein.

Bemerkenswert war zusätzlich ein Minimalwert des cytosolischen und des mitochondrialen Ca^{2+} -Einstroms in Hepatozyten 6 Monate alter mtNOD-Tiere. Ursache hierfür könnte der zu diesem Zeitpunkt einsetzende Verlust der homogenen Struktur des mitochondrialen Netzwerks in der Leber gewesen sein (siehe Punkt 4.2). Interessanterweise war in den Hepatozyten beider Mausstämmen das altersabhängige Muster des *UCP2*-Genexpressionsprofils proportional zum Muster des cytosolischen Ca^{2+} -Einstroms nach Glukosezufuhr. So war auch in Hepatozyten 6 Monate alter mtNOD-Tiere ein Minimalwert der Genexpressionsrate von *UCP2* zu beobachten, während dieser in Hepatozyten 12 Monate alter Kontrolltiere signifikant höher war. Daher könnten Mechanismen in der Zelle existieren, welche die Intensität des cytosolischen Calciumeinstroms über den Grad der *UCP2*-Genexpressionsrate regulieren. Interessanterweise wurde bereits gezeigt, dass auch *UCP2* und *UCP3* den Ca^{2+} -Transport durch die MIM beeinflussen [204, 205].

4.10 Cytosolischen und mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration nach FCCP-Stimulus

FCCP ist ein Entkoppler der Atmungskette. Aufgrund der entkoppelnden Wirkung verursacht FCCP eine Depolarisation des mitochondrialen MMP. Dies wiederum hat einen Calciumausstrom aus den Mitochondrien zur Folge [206]. In der humanen Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y wurde gezeigt, dass FCCP einen mitochondrialen Ca^{2+} -Ausstrom erzeugt, während gleichzeitig die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration angestiegen war [206].

Auch in dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass wenn FCCP auf die Zellen gegeben wurde, die mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration anschließend verringert war, während die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration angestiegen war. Einzig die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration der jungen Kontrollgruppe blieb nahezu unverändert.

Einhergehend mit verringertem MMP in Hepatozyten alter Kontrolltiere war auch der mitochondriale Ca^{2+} -Ausstrom nach FCCP Zugabe tendenziell verringert. In Hepatozyten des mtNOD-Stamms mit erhöhtem MMP im Alter war entsprechend der gegenteilige Effekt zu beobachten. Aufgrund der depolarisierenden Wirkung von FCCP ist es naheliegend, dass der Effekt des mitochondrialen Ca^{2+} -Ausstroms umso größer ist, je höher das MMP vor der FCCP Zugabe war. Allerdings war auffällig, dass der mitochondriale Ca^{2+} -Ausstrom junger Tiere beider Stämme ein ähnliches Niveau erreichte, obwohl das MMP in jungen Kontrolltiere höher war. Mitochondriale Dysfunktionen (siehe Punkt 4.2), aufgrund der Mutation in der Cytochrom-c-Oxidase im mtNOD-Stamm können dafür ursächlich gewesen sein.

Ein Ca^{2+} -Ausstrom aus der Matrix der Mitochondrien sollte direkt einen Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration zu Folge haben. In Hepatozyten junger mtNOD- und alter Kontrollmäuse war dieser Effekt nach FCCP-Gabe zu beobachten. In diesen Zellen kam es bis zu Minute 16 zu einem mitochondrialen Ca^{2+} -Ausstrom, während gleichzeitig ein erhöhter cytosolischer Ca^{2+} -Einstrom zu beobachten war. Auch in Zellen alter mtNOD-Mäuse nahm die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration bis Minute 16 zu. Im Gegensatz zu den jungen mtNOD- und den alten Kontrolltieren nahm die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration danach aber wieder ab. Dies könnte bedeuten, dass das cytosolische Calcium in den Hepatozyten dieser Tiergruppe effektiv ins ER transportiert wurde und so wieder aus dem Cytosol entfernt werden konnte. Da in den Hepatozyten der jungen Kontrolltiere nahezu kein cytosolischer Ca^{2+} -Einstrom detektiert wurde, scheint der Transport des Calciums in das ER dieser Tiergruppe sogar noch schneller von statten gehen zu können.

Da *MFN2*, welches wesentlich die Interaktion zwischen Mitochondrien und ER vermittelt, in Hepatozyten junger Kontrolltiere signifikant höher exprimiert wurde, war auch zu erwarten, dass Calcium, wenn es aus Mitochondrien ausströmt, wieder schneller vom ER aufgenommen werden kann. Dies könnte erklären, warum lediglich ein minimaler cytosolischer Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration in den Hepatozyten der jungen Kontrolltiere detektiert werden konnte. Wenn die Genexpression von *MFN2* in Hepatozyten 6 Monate alter mtNOD-Tiere unberücksichtigt bleibt, so nimmt dessen Expressionsrate in diesem Stamm mit dem Alter zu. Entsprechend stützen diese Daten die Annahme, dass ein Transport von Calcium aus dem Cytosol in das ER in Hepatozyten der älteren Tiere dieses Stammes schneller von statten gehen konnte. Einzig die sehr hohe *MFN2*-Genexpressionsrate in Hepatozyten 6 Monate alter mtNOD-Tiere stimmt nicht mit dieser These überein. Es gilt jedoch zu bedenken, dass zum 6-Monats-Zeitpunkt eine erhöhte Elongationsrate der Mitochondrien noch nicht zu beobachten war. Das könnte bedeuten, dass auch eine erhöhte Konnektivität zwischen Mitochondrien und ER zu diesem Zeitpunkt noch nicht stattgefunden hatte.

5 Zusammenfassung

Mitochondrien sind im Cytosol von eukaryotischen Zellen lokalisiert. Wesentliche Aufgabe dieser Organellen ist die Synthese von ATP, dem universellen Energieträger der Zelle. Mitochondrien besitzen eine eigene zirkuläre DNA, welche für Untereinheiten von Komplexen der mitochondrialen Atmungskette kodiert. In der Atmungskette werden Elektronen in mehreren Energie liefernden Schritten auf Sauerstoff übertragen, wodurch letztendlich an Komplex IV Wasser entsteht. Die dabei gewonnene Energie dient der Synthese von ATP durch oxidative Phosphorylierung. Allerdings können Elektronen vor allem an Komplex I und III in geringem Maße ebenfalls auf Sauerstoff übertragen werden, wodurch Superoxidradikale entstehen. Diese gehören zu den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und sind ein wichtiges Signalmolekül für altersbedingten Stress durch beschädigte Komponenten innerhalb der Zelle. ROS ist jedoch selbst in hoher Konzentration zellschädigend, indem es z.B. mit Nukleinsäuren reagiert, was Mutationen innerhalb mitochondrialer DNA zur Folge haben könnte. MtDNA-Mutationen werden wiederum mit einer Reihe von Krankheiten in Verbindung gebracht. Daher sind Mechanismen der antioxidativen Verteidigung in der Zelle für den Organismus von großer Bedeutung.

In dieser Arbeit sollte die altersabhängige ROS-Produktion in der Leber, dem Muskel und dem Gehirn im C57BL/6NTac-Inzuchtstamm (Kontrolle) untersucht werden. Hierzu lagen in der Literatur bisher noch keine Daten vor. Des Weiteren wurden verschiedene oxidative Verteidigungsmechanismen und die Regulation der Calciumhomöostase in der Leber analysiert. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit der konplastische C57BL/6NTac-mt^{NODLJ}-Mausstamm (mtNOD) verwendet. Dieser unterscheidet sich vom Kontrollstamm durch eine Punktmutation im Gen der mitochondrial kodierten Untereinheit 3 des Komplex IV (COX3) in der Atmungskette.

In beiden Stämmen war eine mit dem Alter ansteigende ROS-Produktion im Muskel und im Gehirn zu beobachten. Allerdings konnte ein deutlicher Anstieg an ROS in diesen Geweben im mtNOD-Stamm schon 3 Monate früher detektiert werden. In der Leber wurde ein einheitlicher Anstieg der ROS-Menge bis zum 9-Monats-Zeitpunkt in beiden Stämmen gemessen. Allerdings war die Metabolismusrate in der Leber junger mtNOD-Tiere deutlich geringer als in den Kontrolltieren. Die hohe ROS-Menge zum 9-Monats-Zeitpunkt ging einher mit einer gesteigerten Genexpressionsrate des mitochondrialen antioxidativen Enzyms SOD2. Erhöhte Expressionsraten cytosolischer antioxidativer Enzyme waren in beiden Stämmen zeitversetzt zu beobachten. Im Kontrollstamm aber nicht im mtNOD-Stamm wurde

zum oxidativen Schutz zusätzlich die *UCP2* Genexpression heraufreguliert. Außerdem deuten die erhobenen Daten darauf hin, dass in Hepatozyten beider Stämme die Mitophagierate im Alter von 9 Monaten erhöht war, was einen gesteigerten Abbau defekter mitochondrialer Strukturen ermöglicht. Allerdings waren in Hepatozyten der mtNOD-Tiere ein erhöhtes MMP als Ursache der erhöhten basalen Metabolismusrate und elongierte Mitochondrien zu beobachten, was eine übermäßige Mitophagie verhindert. Eine erhöhte Metabolismusrate machte sich zusätzlich durch eine gestiegene ATP-Produktion, eine erhöhte COX-Aktivität und durch erhöhte Genexpressionsraten metabolisch bedeutender Enzyme sowie katalytisch wirksamer Untereinheiten der COX bemerkbar. Im Kontrollstamm waren die Metabolismusrate und das MMP im Alter signifikant erniedrigt, was sich auch in einer verringerten ROS-Produktion zeigte. Interessanterweise waren die antioxidativen Schutzmechanismen in der Leber des Kontrollstammes typisch für junge Zellen, während sie im mtNOD-Stamm typisch für seneszente Zellen waren. Auch kam es in den Hepatozyten älterer mtNOD-Tiere zu einem verstärkten apoptischen Schutz. Dies konnte für den Kontrollstamm nicht beobachtet werden, was auf ein erhöhtes Stresslevel im Hepatozyten des mtNOD-Stammes hindeutet und ein Anzeichen für einen beschleunigten Alterungsprozess war. Trotzdem waren in beiden Stämmen die Verteidigungsstrategien in Folge des erhöhten oxidativen Stresses zum 9-Monats-Zeitpunkt insofern erfolgreich, als dass im fortschreitenden Alter eine weiter ansteigende ROS-Produktion nicht detektiert werden konnte. Allerdings waren die Hepatozyten des Kontrollstammes im Gegensatz zum mtNOD-Stamm dazu in der Lage, die ROS-Produktion sogar signifikant im Alter zu verringern.

Calciumionen, die aus dem ER ins Cytoplasma abgegeben werden, können intra- und extramitochondrial die Zellatmung auf verschiedenen Ebenen stimulieren. Entsprechend wird auch die Intensität der ROS-Produktion von der Ca^{2+} -Konzentration in Cytoplasma und der mitochondrialen Matrix beeinflusst. Daher sollte die Regulierung der Calciumhomöostase in Abhängigkeit vom Alter in Hepatozyten beider Stämme untersucht werden.

In gehungerten Hepatozyten des Kontrollstammes war der cytosolische und der mitochondriale Ca^{2+} -Einstrom in älteren Tieren erhöht. Dies war Ursache der erniedrigten basalen Metabolismusrate und der verringerten Konzentration metabolisch wirksamer Enzyme. Daher konnte der Stoffwechsel nach Glukosezufuhr durch die von Calcium vermittelte erhöhte Aktivität dieser Enzyme beschleunigt werden. In den Hepatozyten des mtNOD-Stammes war der entgegengesetzte Effekt zu beobachten. Durch die erhöhte Metabolismusrate in Hepatozyten älterer Tiere war ein verringerter cytosolischer und mitochondrialer Ca^{2+} -

Einstrom im Alter zu beobachten, da eine Erhöhung der Aktivität dieser Enzyme weniger stark von Bedeutung war. Wurde FCCP, ein Entkoppler der mitochondrialen Atmungskette, zu den Hepatozyten gegeben, war generell ein erhöhter mitochondrialer Ca^{2+} -Ausstrom im mtNOD-Stamm zu beobachten. Dies deutet wiederum in Richtung einer mitochondrialen Dysfunktion in diesem Stamm hin. Innerhalb der Stämme war ein mitochondrialer Ca^{2+} -Ausstrom dann verstärkt, wenn das MMP zu diesem Alterszeitpunkt erhöht war. Außerdem ist anzunehmen, dass der Transport von Calcium aus den Mitochondrien ins ER dann schnell von statten gehen konnte, wenn aufgrund einer hohen *MFN2*-Genexpressionsrate eine hohe Konnektivität dieser Organellen gewährleistet war.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die altersabhängige ROS-Produktion in der Leber, dem Muskel und dem Gehirn in zwei Mausstämmen, die sich durch eine Punktmutation im Gen der mitochondrial kodierten Untereinheit 3 der Cytochrom-c-Oxidase unterscheiden, verändert war. Die Ergebnisse machen auch deutlich, dass in der Leber unterschiedliche Strategien zur antioxidativen Verteidigung und Regulation der Calciumhomöostase genutzt werden. Es ist davon auszugehen, dass die Mutation in der mtDNA Ursache der veränderten Mechanismen im mtNOD-Stamm ist. Im Anhang ist zur Übersicht eine graphische Zusammenfassung der erhobenen Daten in der Leber dargestellt (Punkt 6.1, Abbildung 40).

Ob die erhöhte ROS-Produktion Folge der durch die Mutation hervorgerufene verminderte Stabilität von Superkomplexen in der MIM ist, gilt es nun zu klären. So werden zukünftig Western Blot und die native Gelelektrophorese im Vordergrund weiterführender Untersuchungen stehen, um die aufgestellten Thesen auf Proteinebene zu bestätigen. Zudem sollen fluoreszenzmikroskopische Techniken angewendet werden, um postulierte Interaktionen in der lebenden Zelle nachzuweisen. Interessant erscheint auch, andere Gewebe wie Muskel und Gehirn gleichermaßen weiterführend zu untersuchen.

6 Anhang

6.1 Graphische Zusammenfassung der erhobenen Daten in der Leber

In Abbildung 40 sind altersabhängige Unterschiede der ROS-Produktion, der antioxidativen Abwehr und der Calciumhomöostase graphisch dargestellt.

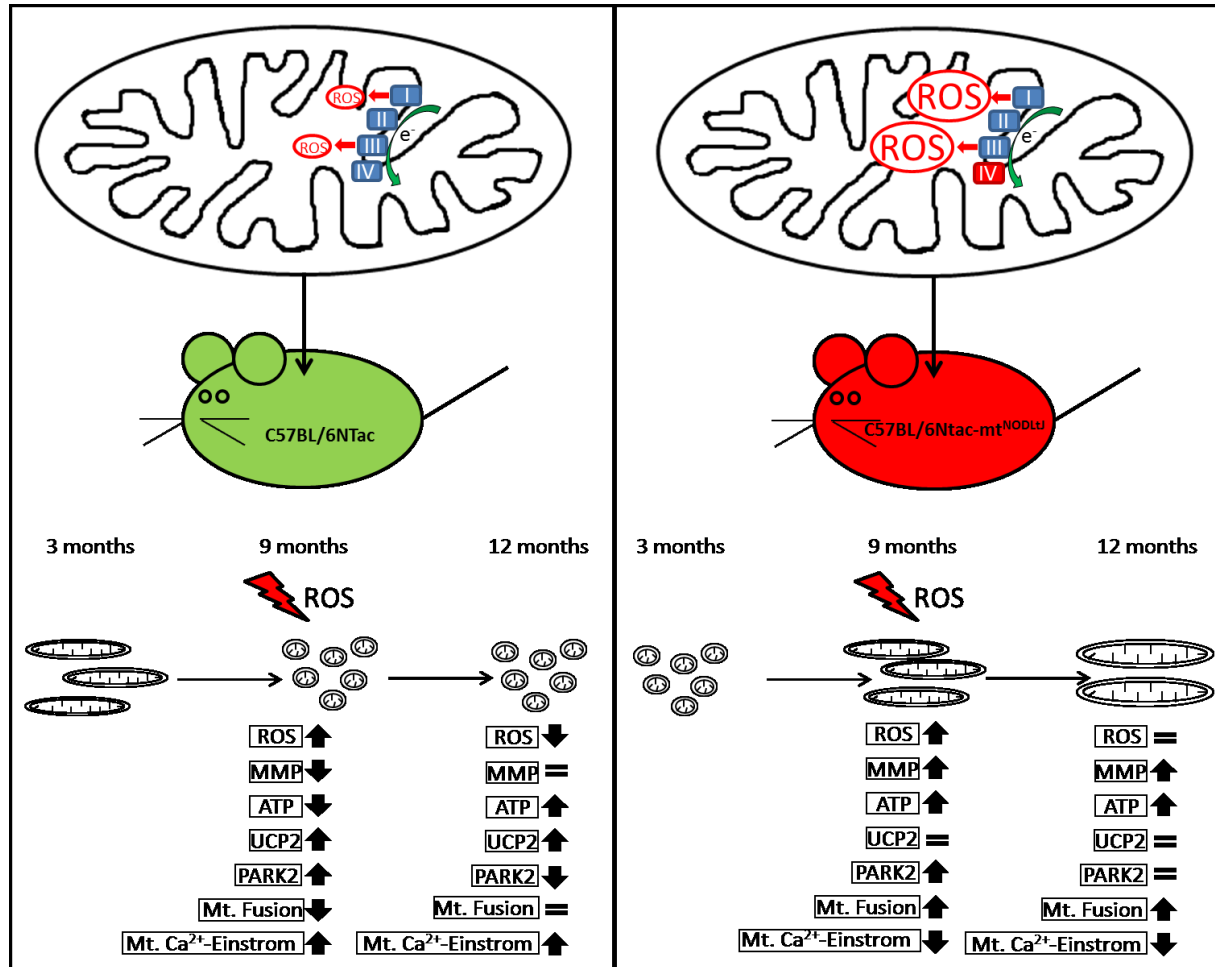


Abbildung 40: Graphische Zusammenfassung der erhobenen Daten in der Leber. Eine erhöhte ROS-Produktion konnte in beiden Stämmen nach 9 Monaten detektiert werden. Infolgedessen verringerte sich die Metabolismusrate (ATP-Produktion ↓, MMP ↓, UCP2 ↑) und fragmentierten die Mitochondrien im Kontrollstamm. Im mtNOD-Stamm war der gegenteilige Effekt zu beobachten. Um die reduzierte Metabolismusrate zu kompensieren, nahm in gehungerten Hepatozyten des Kontrollstamms nach Glukosestimulus der mitochondriale Ca²⁺-Einstrom zu. Zum 12-Monats-Zeitpunkt konnte im Kontrollstamm eine Reduktion der ROS-Produktion detektiert werden. Dies konnte im mtNOD-Stamm nicht beobachtet werden. Ursache hierfür ist die Mutation in Untereinheit 3 des Komplex IV der Atmungskette. Infolge der verringerten ROS-Produktion war im Kontrollstamm zum 12-Monats-Zeitpunkt auch die Expressionsrate des für Mitophagie bedeutenden Enzyms PARK2 herunterreguliert.

6.2 Vergleichende Analyse der verwendeten Fluoreszenzproteine

Hepatozyten 3 Monate alter Kontroll- und mtNOD-Mäuse wurden mit dem mitochondrialen CAR-GECO1-Vektor transfiziert. Die Versuchsdurchführung verlief wie in Punkt 3.9.2. In Abbildung 41 sind die glukoseabhängigen Fluoreszenzintensitäten des GEM-GECO1- und des CAR-GECO1-Fluoreszenzproteins in Hepatozyten 3 Monate alter Tiere beider Stämme gegenüber gestellt.

Es war erwartet worden, dass bei einem Anstieg der Calciumkonzentration in den Mitochondrien die Fluoreszenzintensität des mitochondrialen GEM-GECO1-Proteins nach der angewendeten Messmethode geringer werden würde [157]. Entsprechend würde ein Anstieg der Fluoreszenzintensität nach Glukosestimulus auf einen Ca^{2+} -Ausstrom aus der mitochondrialen Matrix hindeuten (Abbildung 41 a). Allerdings kam es nach Transfektion der Hepatozyten mit dem mitochondrialen CAR-GECO1-Vektor ebenfalls zu einer erhöhten Fluoreszenzintensität in den Mitochondrien der Hepatozyten nach Glukosestimulus (Abbildung 41 b). Dies ist verwunderlich, da ein Anstieg der Fluoreszenz des CAR-GECO1-Proteins auf einen Ca^{2+} -Einstrom in die mitochondriale Matrix hindeutet. Da das CAR-GECO1-Protein wesentlich sensibler auf die Ca^{2+} -Konzentration im umgebenden Milieu reagiert, wurde angenommen, dass ein Anstieg der Fluoreszenzintensität des GEM-GECO1-Proteins entgegen den Erwartungen ebenfalls eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration im umgebenden Milieu anzeigt.

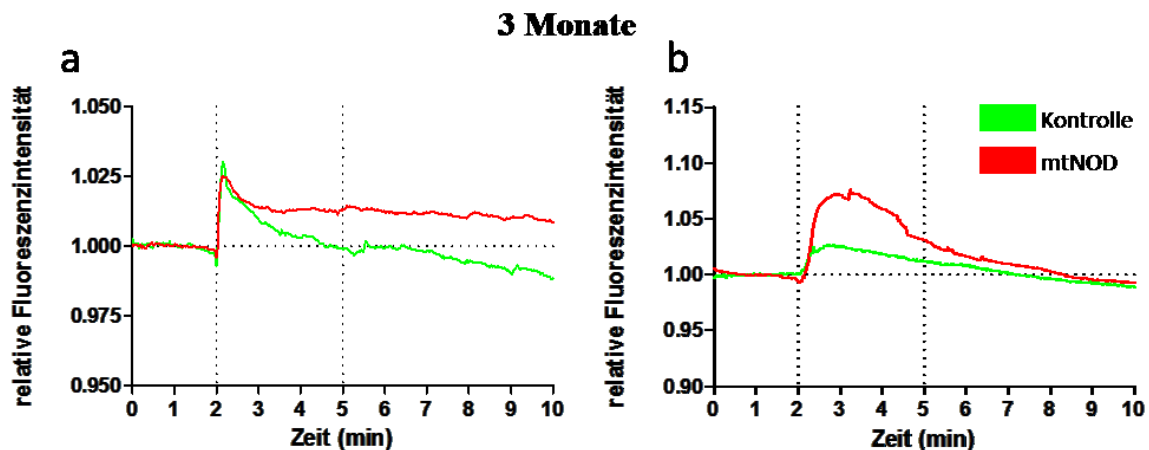


Abbildung 41: Vergleich der glukoseabhängigen Fluoreszenzintensitäten beider Fluoreszenzproteine. Hepatozyten 3 Monate alter Kontroll- und mtNOD-Tiere wurden mit dem mitochondrialen GEM-GECO1 (a) und dem mitochondrialen CAR-GECO1-Vektor transfiziert. Die Fluoreszenzintensität beider in den Mitochondrien lokalisierten Fluoreszenzproteine steigt in Folge der Glukosegabe nach 2 min an. Trotzdem ist der Anstieg der Fluoreszenzintensität in den Zellen, welche mit dem CAR-GECO1-Vektor transfiziert worden sind wesentlich intensiver (n = 9 Hepatozyten von je 3 Tieren).

6.3 Mitochondriale Netzwerkstruktur weiterer konplastischer Stämme

Zusätzlich zu Kontroll- und mtNOD-Stamm wurde das mitochondriale Netzwerk in Lebergewebe der konplastischen Mausstämme C57BL/6J-mt^{FVB/NJ} (mtFVB), C57BL/6J-mt^{129S1/SvlmJ} (mt129) und C57BL/6J-mt^{ALR/LtJ} (mtALR) analysiert. Die Auswertung erfolgte wie in Punkt 2.18 beschrieben. Diese konplastischen Stämme tragen ebenfalls Punktmutationen im mitochondrialen Genom, die unterschiedliche Komplexe der mitochondrialen Atmungskette betreffen. Die verschiedenen Punktmutationen der Stämme sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Punktmutationen der untersuchten konplastischen Stämme.

Stamm	Gen	Aminosäureaustausch	Komplex
mtNOD	<i>COX3</i>	Val-Ile	IV
mtFVB	<i>ATP8</i>	Asp-Tyr	ATP-Synthase
mt129	<i>CYSTB</i>	Ile-Val	III
mtALR	<i>ND2</i>	Leu-Met	I

In allen untersuchten Stämmen nahm der Anteil von akkumulierten Mitochondrien im Lebergewebe mit dem Alter zu (Abbildung 42). Ein signifikanter Anstieg akkumulierter Mitochondrien im Alter von 6 Monaten im Vergleich zu 3 Monate alten Tieren konnte allerdings nur im mtNOD-Stamm gezeigt werden.

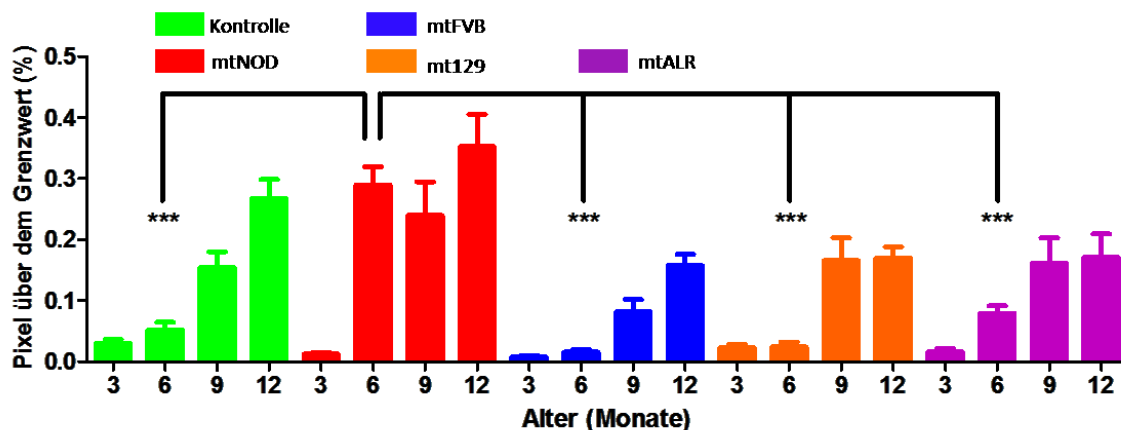


Abbildung 42: Analyse des mitochondrialen Netzwerks in Lebergewebe verschiedener konplastischer Stämme. Veränderungen der Homogenität des mitochondrialen Netzwerks der Leber wurden im Kontroll- (grün), mtNOD- (rot), mtFVB- (blau), mt129 (orange) und mtALR-Stamm (lila) untersucht. Es wurde der prozentuale Anteil von Pixeln mit einer Fluoreszenzintensität > 1000 im entsprechenden Fluoreszenzkanal der Aufnahmen bestimmt. Je höher der Wert ist, desto inhomogener ist die mitochondriale Netzwerkstruktur im Gewebe (n = 15–30 Bilde von 3–6 Tieren).

6.4 Material

6.4.1 Chemikalien und Fertiglösungen

Albumin	PAA, Cölbe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kollagenase (Collagenase NB 8)	SERVA Electrophoresis; Heidelberg
Dexamethason	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EGTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
FCCP	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Life technologies, Carlsbad, USA
Glucose	Merck, Darmstadt
Heparin-Natrium-5000	Ratiopharm, Ulm
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
Insulin	Sanofi, Paris, Frankreich
KCl	Merck, Darmstadt
Ketamin 10 %	Bela-Pharm, Vechta
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	PAA, Cölbe
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MitoTracker [®] Deep Red FM	Life technologies, Carlsbad, USA
MitoTracker [®] Green FM	Life technologies, Carlsbad, USA
MitoSOX Red Mitochondrial Superoxide Indikator	Life technologies, Carlsbad, USA
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
PBS	PAA, Cölbe
Penicillin-Streptomycin	Life technologies, Carlsbad, USA
Phosphoenolpyruvat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Plasmid CMV-CAR-GECO1	Addgene, Cambridge, USA
Plasmid CMV-Mito-GEM-GECO1	Addgene, Cambridge, USA
PromoFectin-Hepatocyte	PromoKine, Heidelberg
Pyruvatkinase	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RNase-freies H ₂ O	Qiagen, Hilden
Rompun 2 %	Bayer HealthCare, Leverkusen
Roti [®] -Mount FluorCare DAPI	Carl Roth, Karlsruhe
SYBR Green Mastermix [®]	Qiagen, Hilden
TaqMan [®] 2X Universal Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
Tissue-Tek [®] O.C.T [™] Compound Kryomatrix	Sakura Finetek, Staufen

TMRE
 Trypanblau
 VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI
 Williams E Medium

Life technologies, Carlsbad, USA
 Chemapol, Prag, Tschechien
 Vector Lab., Burlingame, USA
 Merck, Darmstadt

6.4.2 TaqMan® Gen Expression Assays

Die TaqMan Gen Expression Assays stammen jeweils von Life technologies (Carlsbad, USA).

Gen-Symbol	Assay-Kennung
GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-DH)	Mm99999915_g1
CAT (Katalase)	Mm01340247_m1
COX1 (Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 1)	Mm04225243_g1
COX3 (Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 3)	Mm04225261_g1
COX5a (Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 5a)	Mm00432638_m1
COX6a1 (Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 6a1)	Mm01612194_m1
COX6b1 (Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 6b1)	Mm00824357_m1
DNM1L (Dynamin-Related Protein1)	Mm01342903_m1
FIS1 (Mitochondriales Fission Protein 1)	Mm00481580_m1
MCU (Mitochondrialer Calcium Uniporter)	Mm03951306_g1
MFF (Mitochondrialer Fission Faktor)	Mm00512718_m1
MFN1 (Mitofusin 1)	Mm01289369_m1
MFN2 (Mitofusin 2)	Mm01255785_m1
MICU1 (Mitochondriale Calcium Aufnahme 1)	Mm00522778_m1
OPA1 (Dynamin homologes 120 kDa Protein)	Mm01349716_m1
PARK2 (Parkin)	Mm00450187_m1
PARK7; DJ1 (Parkinson Protein 7)	Mm00498538_m1
PCX (Pyruvatdecarboxylase)	Mm00500992_m1
PINK1 (Serin/Threonin-Protein Kinase)	Mm00550827_m1
RNR2 (16S rRNA)	Mm04260181_s1
SLC25A23 (Mitochondrialer Carrier 23)	Mm01232022_m1
SOD1 (Superoxiddismutase 1)	Mm01700393_g1
SOD2 (Superoxiddismutase 2)	Mm00690588_m1
TFAM (mitochondrialer Transkriptionsfaktor 1)	Mm00447485_m1
TRAP1 (mt. Hitzeschockprotein 75 kDa)	Mm00446003_m1
UCP2 (Uncoupling Protein 2)	Mm00627599_m1
VDAC1 (Spannungsabhängiger anionenselektiver Kanal 1)	Mm01288672_g1

6.4.3 Kits

ATPlite™ Luminescence Assay System
Complex IV Rodent Enzyme Activity MP Assay Kit
Maxima™ first strand cDNA synth. kit for RT-qPCR
NovaQUANT™ Mouse Mito. to Nuclear Ratio Kit
QIAmp DNA Mini Kit
QIAshredder
QuantiPro™ BCA Assay Kit
RNeasy Mini Kit®

Perkin-Elmer, Waltham, USA
Abcam, Cambridge, UK
Thermo Scientific, Waltham, USA
Merck, Darmstadt
Qiagen, Venlo, Niederlande
Qiagen, Venlo, Niederlande
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Qiagen, Venlo, Niederlande

6.4.4 Gebrauchsmaterialien

35 mm Glas Bottom Dishes (Kollagen beschichtet)
6 Well Platten
96 Well Microplatten
96 Well PCR-Platte
Deckgläschen
Gaze
Katheter Vasofix Safety 24G
Objektträger
Verschlussfolie für RT-PCR

MatTek Corp., Ashland, USA
Greiner, Kremsmünster, Österreich
Greiner, Kremsmünster, Österreich
nerbe plus, Winsen/Luhe
Menzel-Gläser, Braunschweig
Hartmann Gruppe, Heidenheim
B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Engelbrecht, Edermünde, Österreich
nerbe plus, Winsen/Luhe

6.4.5 Geräte

60x 1,35 UPESAPO Ölimmersions Objektiv
7900HT FAST Real-time PCR System
Bürker Zählkammer
CM 1850 Kryostat
DAPI/FITC/TRITC Tripleband HC Filterset
Excellence^R-Fluoreszenzmikroskop System
Fluoview FV10i
Inkubationsschrank BB 6220
Inverses Mikroskop Olympus CK2
Megafuge 1.0R
Mikro 20 Zentrifuge
Mikro 22 R Zentrifuge
Nanodrop 2000 Photometer
Photometer 1420 Multilabel Counter Victor3
Precellys 24 Homogenisator
T 6030 Trockenschrank
Thermal Cycler
Transmission Filterset F76-520
Variomag Monoshake

Olympus, Tokio, Japan
Applied Biosystems, Darmstadt
Poly-Optik GmbH, Bad Blankenburg
Leica Biosystems, Nußloch
AHF Analysetechnik, Tübingen
Olympus, Tokio, Japan
Olympus, Tokio, Japan
Heraeus, Hanau
Olympus, Tokio, Japan
Heraeus, Hanau
Hettich, Tuttlingen
Hettich, Tuttlingen
Thermo Scientific, Waltham, USA
Perkin-Elmer, Waltham, USA
Precellys, Villeurbanne, Frankreich
Heraeus, Hanau
SensoQuest, Göttingen
AHF Analysetechnik, Tübingen
Thermo Scientific, Waltham, USA

6.4.6 Software

AutoQuant X image Deconvolution (2.2.1)
FV10-ASW (2.0)
GraphPad Prism 5 (5.00)
ImageJ (1.37c)
ImageJ WCIF bundle plugins
Jmol (13.0.4)
NanoDrop 2000/2000c (1.2.1)
SDS (2.3)
SDS RQ Manager (1.2)
Wallac 1420 Workstation (3.00)
xcellence rt (1.2)

Media Cybernetics, Rockville, USA
Olympus, Tokio, Japan
GraphPad Software, La Jolla; USA
NIH, Bethesda, USA
WCIF, Toronto, Kanada
Jmol Development Team
Thermo Scientific, Waltham, USA
Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Perkin Elmer, Waltham, USA
Olympus, Tokio, Japan

6.4.7 Angesetzte Lösungen

Puffer A, ATP-Messung (pH 7,75)

HEPES	20 mmol/l
MgCl ₂	3 mmol/l

Modifiziertes Williams E Medium:

500 ml Williams E Medium
5 % L-Glutamin (200 mmol/l)
0,5 % Insulin (40 I.E./ml)
10 % FCS
1 % Penicillin-Streptomycin
0,01 % Dexamethason

Krebs-Ringer-Lösung (pH 7,4):

NaCl	123,4 mmol/l
KCl	4,7 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,9 mmol/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,2 mmol/l
HEPES	10,1 mmol/l
NaHCO ₃	20,0 mmol/l
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2,6 mmol/l
BSA	0,5 % (w/v)

Puffer I, Hepatozytenisolierung (Ca²⁺-frei, pH 7,2):

NaCl	140 mmol/l
KCl	4,7 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,2 mmol/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,65 mmol/l
HEPES	10 mmol/l

Puffer II, Hepatozytenisolierung (Ca^{2+} -frei):

Puffer I + EGTA (0,2 mmol/l)

Puffer III, Hepatozytenisolierung:

Puffer I + CaCl_2 (500 mmol/l)

Puffer IV, Hepatozytenisolierung (pH 7,2)

NaCl	115 mmol/l
KCl	0,35 mmol/l
KH_2PO_4	0,16 mmol/l
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,296 mmol/l
HEPES	2,38 mmol/l
NaHCO_3	20 mmol/l
CaCl_2	2,6 mmol/l
Glucose	5 mmol/l
Albumin	30,2 mmol/l

7 Literatur

1. Kiselycznyk, C., Holmes, A., *All (C57BL/6) Mice are not Created Equal*. Front Neurosci., 2011. **5**: p. 1-3.
2. Taconic Biosciences, *C57BL76 Background Model Description*. 2014.
3. The Jackson Laboratory, *Conplastic strains*. 2015.
4. Leiter, E., Prochazka, M., Coleman, DL., *The non-obese diabetic (NOD) mouse*. Am J Pathol., 1987. **182**(2): p. 380-383.
5. Yu, X., Gimsa, U., Wester-Rosenlöf, L., Kanitz, E., Otten, W., Kunz, M., Ibrahim, SM., *Dissecting the effects of mtDNA variations on complex traits using mouse conplastic strains*. Genome Res., 2009. **19**(1): p. 159-165.
6. Wilson, K., Prochaska, LJ., *Phospholipid vesicles containing bovine heart mitochondrial cytochrome c oxidase and subunit III-deficient enzyme: analysis of respiratory control and proton translocating activities*. Arch. Biochem. Biophys., 1990. **282**(2): p. 413-420.
7. Winge, D., *Sealing the mitochondrial respirasome*. Mol Cell Biol., 2012. **32**(14): p. 2647-2652.
8. Hirsch-Kauffmann, M., Schweiger, M., *Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Georg Thieme Verlag KG, 2006(6).
9. Johnson, K., Zheng, QY., Bykhovskaya, Y., Spirina, O., Fischel-Ghodsian, N., *A nuclear-mitochondrial DNA interaction affecting hearing impairment in mice*. Nat Genet., 2001. **27**(2): p. 191-194.
10. Harrison, D., *Gerontology: mechanisms of aging*. The Jackson Laboratory, 2011.
11. Gray, M., Burger, G., Lang, BF., *The origin and early evolution of mitochondria*. Genome biology. , 2001. **2**(6).
12. Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., Deutzmann, R., *Biochemie*. Georg Thieme Verlag KG, 2012(3).
13. Degli Esposti, D., Hamelin, J., Bosselut, N., Saffroy, R., Sebah, M., Pommier, A., Martel, C., Lemoine, A., *Mitochondrial roles and cytoprotection in chronic liver injury*. Biochem Res Int., 2012. **2012**.
14. Heinrich, P., Müller, M., Graeve, L., *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Verlag, 2014(9).
15. Wallace, D., *Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine*. Annu Rev Biochem., 2007. **76**: p. 781-821.
16. Kasamatsu, H., Vinograd, J., *Replication of circular DNA in eukaryotic cells*. . Annu Rev Biochem., 1974. **43**: p. 695-719.
17. Parisi, M., Clayton, DA., *Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins*. Science., 1991. **252**(5008): p. 965-969.
18. Kanki, T., Ohgaki, K., Gaspari, M., Gustafsson, CM., Fukuoh, A., Sasaki, N., Hamasaki, N. and D. Kang, *Architectural role of mitochondrial transcription factor A in maintenance of human mitochondrial DNA*. Mol Biol Cell., 2004. **24**(22): p. 9823-9834.
19. Kanki, T., Nakayama, H., Sasaki, N., Takio, K., Alam, TI., Hamasaki, N., Kang, D., *Mitochondrial nucleoid and transcription factor A*. Ann N Y Acad Sci., 2004. **1011**: p. 61-68.
20. Wallace, D., Ye, JH., Neckelmann, SN., Singh, G., Webster, KA., Greenberg, BD., *Sequence analysis of cDNAs for the human and bovine ATP synthase beta subunit: mitochondrial DNA genes sustain seventeen times more mutations*. Curr Genet., 1987. **12**(2): p. 81-90.

21. Pello, R., Martin, MA., Carelli, V., Nijtmans, LG., Achilli, A., Pala M., Torroni, A., Gomez-Duran, A., Ruiz-Pesini, E., Martinuzzi, A., Smeitink, JA., Arenas, J., Ugalde, C., *Mitochondrial DNA background modulates the assembly kinetics of OXPHOS complexes in a cellular model of mitochondrial disease*. Hum Mol Genet., 2008. **17**(24): p. 4001-4011.
22. Okamoto, K., Shaw, JM., *Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes*. Annu Rev Genet., 2005. **39**: p. 503-536.
23. Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, DL., van der Bliek, AM., *Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells*. Mol Biol Cell., 2001. **12**(8): p. 2245-2256.
24. James, D., Parone, PA., Mattenberger, Y., Martinou, JC., *hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery*. J Biol Chem., 2003. **278**(38): p. 36373-36379.
25. Otera, H., Wang, C., Cleland, MM., Setoguchi, K., Yokota, S., Youle, RJ., Mihara, K., *Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells*. J Cell Biol., 2010. **191**(6): p. 1141-1158.
26. Otera, H., Ishihara, N., Mihara, K., *New insights into the function and regulation of mitochondrial fission*. Biochim Biophys Acta., 2013. **1833**(5): p. 1256-1268.
27. Hall, A., Burke, N., Dongworth, RK., Hausenloy, DJ., *Mitochondrial fusion and fission proteins: novel therapeutic targets for combating cardiovascular disease*. Br J Pharmacol., 2014. **171**(8): p. 1890-1906.
28. Song, Z., Chen, H., Fiket, M., Alexander, C., Chan, DC., *OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L*. JCB Home., 2007. **178**(5): p. 749-755.
29. Chen, H., Detmer, SA., Ewald, AJ., Griffin, EE., Fraser, SE., Chan, DC., *Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development*. J Cell Biol., 2003. **160**(2): p. 189-200.
30. Koshiba, T., Detmer, SA., Kaiser, JT., Chen, H., McCaffery, JM., Chan, DC., *Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes*. Science., 2004. **305**(5685): p. 858-862.
31. Chen, H., Chan, DC., *Physiological functions of mitochondrial fusion*. Ann N Y: Acad. Sci., 2010. **1201**(2): p. 21-25.
32. Chinnery, P., Schon, EA., *Mitochondria*. J Neurol Neurosurg Psychiatry., 2003. **74**(9): p. 1188-1199.
33. Schägger, H., Pfeiffer, K., *The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes*. J Biol Chem., 2001. **276**(41): p. 37861-37867.
34. Schägger, H., *Respiratory chain supercomplexes*. IUBMB Life., 2001. **52**(3-5): p. 119-128.
35. Koene, S., Rodenburg, RJ., van der Knaap, MS., Willemsen, MA., Sperl, W., Laugel, V., Ostergaard, E., Tarnopolsky, M., Martin, MA., Nesbitt, V., Fletcher, J., Edvardson, S., Procaccio, V., Slama, A., van den Heuvel, LP., Smeitink, JA., *Natural disease course and genotype-phenotype correlations in Complex I deficiency caused by nuclear gene defects: what we learned from 130 cases*. J Inherit Metab Dis., 2012. **35**(5): p. 737-747.
36. Guénebaut, V., Schlitt, A., Weiss, H., Leonard, K., Friedrich, T., *Consistent structure between bacterial and mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I)*. J Mol Biol., 1998. **276**(1): p. 105-112.
37. Walker, J., *The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains*. Q Rev Biophys., 1992. **25**(3): p. 253-324.

38. Hirst, J., Carroll, J., Fearnley, IM., Shannon, RJ., Walker, JE., *The nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria*. Biochim Biophys Acta., 2003. **160**(3): p. 135-150.
39. Hirst, J., *Towards the molecular mechanism of respiratory complex I*. Biochem J., 2009. **425**(2): p. 327-339.
40. Iwata, S., Lee, JW., Okada, K., Lee, JK., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, TA., Ramaswamy, S., Jap, BK., *Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc₁ complex*. Science., 1998. **281**(5373): p. 64-71.
41. Anderson, S., Bankier, AT., Barrell, BG., de Bruijn, MH., Coulson, AR., Drouin, J., Eperon, IC., Nierlich, DP., Roe, BA., Sanger, F., Schreier, PH., Smith, AJ., Staden, R., Young, IG., *Sequence and organization of the human mitochondrial genome*. Aust J Exp Biol Med Sci., 1981. **59**(3): p. 347-356.
42. Crofts, A., Holland, JT., Victoria, D., Kolling, DR., Dikanov, SA., Gilbreth, R., Lhee, S., Kuras, R., Kuras, MG., *The Q-cycle reviewed: How well does a monomeric mechanism of the bc₁ complex account for the function of a dimeric complex?* Biochim Biophys Acta., 2008. **1777**(7-8): p. 1001-1019.
43. Balsa, E., Marco, R., Perales-Clemente, E., Szklarczyk, R., Calvo, E., Landázuri, MO., Enríquez, JA., *NDUFA4 is a subunit of complex IV of the mammalian electron transport chain*. Cell Metab., 2012. **16**(3): p. 378-386.
44. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yoshikawa, S., *The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å*. Science, 1996. **272**(5265): p. 1136-1144.
45. Khalimonchuk, O., Rödel, G., *Biogenesis of cytochrome c oxidase*. Mitochondrion., 2005. **5**(6): p. 363-388.
46. Nakashima, S., Ogura, T., Kitagawa, T., *Infrared and Raman spectroscopic investigation of the reaction mechanism of cytochrome c oxidase*. Biochim Biophys Acta., 2015. **1847**(1): p. 86-97.
47. Kaila, V., Oksanen, E., Goldman, A., Bloch, DA., Verkhovsky, M., Sundholm, D., Wikström, M., *A combined quantum chemical and crystallographic study on the oxidized binuclear center of cytochrome c oxidase*. Biochim Biophys Acta., 2011. **1807**(7): p. 769-778.
48. Ishigami, I., Hikita, M., Egawa, T., Yeh, SR., Rousseau, DL., *Proton translocation in cytochrome c oxidase: insights from proton exchange kinetics and vibrational spectroscopy*. Biochim Biophys Acta., 2015. **1847**(1): p. 98-108.
49. Walker, J., *The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown*. Biochem Soc Trans. , 2013. **41**(1): p. 1-16.
50. Hejzlarová, K., Mráček, T., Vrbacký, M., Kaplanová, V., Karbanová, V., Nůsková, H., Pecina, P., Houštěk, J., *Nuclear genetic defects of mitochondrial ATP synthase*. Physiol Res., 2014. **63**(1): p. 57-71.
51. Boyer, P., *The binding change mechanism for ATP synthase ? Some probabilities and possibilities*. Biochim. Biophys. Acta., 1993. **1140**(3): p. 215-250.
52. Fuchs, G., *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag KG, 2014(9).
53. Lee, J., Giordano, S., Zhang, J., *Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling*. Biochem J., 2012. **441**(2): p. 523-540.
54. Cesaratto, L., Vascotto, C., Calligaris, S., Tell, G., *The importance of redox state in liver damage*. Ann Hepatol., 2004. **3**(3): p. 86-92.
55. Cichoż-Lach, H., Michalak, A., *Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases*. World J Gastroenterol., 2014. **20**(25): p. 8082-8091.

56. Martínez, M., Andriantsitohaina, R., *Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease*. Antioxid Redox Signal., 2009. **11**(3): p. 669-702.
57. Zapico, S., Ubelaker, DH., *mtDNA Mutations and Their Role in Aging, Diseases and Forensic Sciences*. Aging Dis., 2013. **4**(6): p. 364-380.
58. Milani, P., Ambrosi, G., Gammoh, O., Blandini, F., Cereda, C., *SOD1 and DJ-1 converge at Nrf2 pathway: a clue for antioxidant therapeutic potential in neurodegeneration*. Oxid Med Cell Longev., 2013. **2013**.
59. Lushchak, V., *Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification*. Chem Biol Interact., 2014. **224**: p. 164-175.
60. Kussmaul, L., Hirst, J., *The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria*. Proc Natl Acad Sci U S A., 2006. **103**(20): p. 7607-7612.
61. Brand, M., *The sites and topology of mitochondrial superoxide production*. Exp Gerontol., 2010. **45**(7-8): p. 466-472.
62. Chen, Q., Vazquez, EJ., Moghaddas, S., Hoppel, CL., Lesnefsky, EJ., *Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III*. J Biol Chem., 2003. **278**(38): p. 36027-36031.
63. Cape, J., Bowman, MK., Kramer, DM., *A semiquinone intermediate generated at the Qo site of the cytochrome bc1 complex: importance for the Q-cycle and superoxide production*. Proc Natl Acad Sci U S A., 2007. **104**(19): p. 7887-7892.
64. Miwa, S., St-Pierre, J., Partridge, L., Brand, MD., *Superoxide and hydrogen peroxide production by Drosophila mitochondria*. Free Radic Biol Med., 2003. **35**(8): p. 938-948.
65. Yankovskaya, V., Horsefield, R., Törnroth, S., Luna-Chavez, C., Miyoshi, H., Léger, C., Byrne, B., Cecchini, G., Iwata, S., *Architecture of Succinate Dehydrogenase and Reactive Oxygen Species Generation*. Science., 2003. **299**(5607): p. 700-704.
66. Drahota, Z., Chowdhury, SK., Floryk, D., Mráček, T., Wilhelm, J., Rauchová, H., Lenaz, G., Houstek, J., *Glycerophosphate-dependent hydrogen peroxide production by brown adipose tissue mitochondria and its activation by ferricyanide*. J Bioenerg Biomembr., 2002. **34**(2): p. 105-113.
67. St-Pierre, J., Buckingham, JA., Roebuck, SJ., Brand, MD., *Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain*. J Biol Chem., 2002. **277**(47): p. 44784-44790.
68. Starkov, A., Fiskum, G., Chinopoulos, C., Lorenzo, BJ., Browne, SE., Patel, MS., Beal MF., *Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species*. J Neurosci., 2004. **24**(36): p. 7779-7788.
69. Jezek, P., Hlavatá, L., *Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism*. Int J Biochem Cell Biol., 2005. **37**(12): p. 2478-2503.
70. Reddy, J., Hashimoto, T., *Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system*. Annu Rev Nutr., 2001. **21**: p. 193-231.
71. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 2002(4).
72. Fridovich, I., *Superoxide radical and superoxide dismutases*. Annu. Rev. biochem., 1995. **64**: p. 97-112.
73. Abreu, I., Cabelli, DE., *Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations*. Biochim Biophys Acta., 2010. **1804**(2): p. 263-274.
74. Hough, M., Hasnain, SS., *Structure of fully reduced bovine copper zinc superoxide dismutase at 1.15 Å*. Structure., 2003. **11**(8): p. 937-946.

75. Bull, C., Niederboffe, EC., Yoshida, T., Fee, JA., *Kinetic studies of superoxide dismutases: properties of the manganese-containing protein from Thermus thermophilus*. J. Am. Chem. Soc., 1991. **113**(11): p. 4069-4076.
76. Buettner, G., Ng, CF., Wang, M., Rodgers, VG., Schafer, FQ., *A New Paradigm: Manganese Superoxide Dismutase Influences the Production of H₂O₂ in Cells and Thereby Their Biological State*. Free Radic Biol Med., 2006. **41**(8): p. 1338-1350.
77. Nicholls, P., Fita, I., Loewen, PC., *Enzymology and structure of catalases*. Adv. Inorg. Chem., 2001. **51**: p. 51-106.
78. Kirkman, H., Gaetani, GF., *Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries*. Trends Biochem Sci., 2007. **32**(1): p. 44-50.
79. Andreoletti, P., Gambarelli, S., Sainz, G., Stojanoff, V., White, C., Desfonds, G., Gagnon, J., Gaillard, J., Jouve, HM., *Formation of a tyrosyl radical intermediate in Proteus mirabilis catalase by directed mutagenesis and consequences for nucleotide reactivity*. Biochemistry., 2001. **40**(45): p. 13734-13743.
80. Aoyama, K., Matsubara, K., Kobayashi, S., *Aging and oxidative stress in progressive supranuclear palsy*. Eur J Neurol., 2006. **13**(1): p. 89-92.
81. Wilson, S., Zucker, PA., Huang, RRC., Spector, A., *Development of synthetic compounds with glutathione peroxidase activity*. J. Am. Chem. Soc., 1989. **111**(15): p. 5936-5939.
82. Muges, G., Panda, A., Singh, HB., Puneekar, NS., Butcher, RJ., *Glutathione peroxidase-like antioxidant activity of diaryl diselenides: A mechanistic study*. J Am Chem Soc., 2001. **123**(5): p. 839-850.
83. Deponte, M., *Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes*. Biochim. Biophys. Acta., 2013. **1830**(5): p. 3217–3266.
84. Honbou, K., Suzuki, NN., Horiuchi, M., Niki, T., Taira, T., Ariga, H., Inagaki, F., *The crystal structure of DJ-1, a protein related to male fertility and Parkinson's disease*. J Biol Chem., 2003. **278**(33): p. 31380-31384.
85. Nagakubo, D., Taira, T., Kitaura, H., Ikeda, M., Tamai, K., Iguchi-Ariga, SMM., and Ariga, H., *DJ-1, a Novel Oncogene Which Transforms Mouse NIH3T3 Cells in Cooperation withras*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1997. **231**: p. 509-513.
86. Irrcher, I., Aleyasin, H., Seifert, EL., Hewitt, SJ., Chhabra, S., Phillips, M., Lutz, AK., Rousseaux, MW., Bevilacqua, L., Jahani-Asl, A., Callaghan, S., MacLaurin, JG., Winklhofer, KF., Rizzu, P., Rippstein, P., Kim, RH., Chen, CX., Fon, EA., Slack, RS., Harper, ME., McBride, HM., Mak, TW., Park, DS., *Loss of the Parkinson's disease-linked gene DJ-1 perturbs mitochondrial dynamics*. Hum Mol Genet., 2010. **19**(19): p. 3734-3746.
87. Kim, S., Park, YJ., Hwang, IY., Youdim, MB., Park, KS., Oh, YJ., *Nuclear translocation of DJ-1 during oxidative stress-induced neuronal cell death*. Free Radic Biol Med., 2012. **53**(4): p. 936-950.
88. Kinumi, T., Kimata, J., Taira, T., Ariga, H., Niki, E., *Cysteine-106 of DJ-1 is the most sensitive cysteine residue to hydrogen peroxide-mediated oxidation in vivo in human umbilical vein endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun., 2004. **317**(3): p. 722-728.
89. Takahashi-Nikia, K., Nikia, T., Tairaa, T., Iguchi-Arigaa, SM., Arigaa, H., *Reduced anti-oxidative stress activities of DJ-1 mutants found in Parkinson's disease patients*. Biochem Biophys Res Commun., 2004. **320**(2): p. 389-397.
90. Wang, Z., Liu, J., Chen, S., Wang, Y., Cao, L., Zhang, Y., Kang, W., Li, H., Gui, Y., Chen, S., Ding, J., *DJ-1 modulates the expression of Cu/Zn-superoxide dismutase-1 through the Erk1/2-Elk1 pathway in neuroprotection*. Ann Neurol., 2011. **70**(4): p. 591-599.

91. Starkov, A., Fiskum, G., *Regulation of brain mitochondrial H₂O₂ production by membrane potential and NAD(P)H redox state*. J Neurochem., 2003. **86**(5): p. 1101-1107.
92. Brand, M., Esteves, TC., *Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3*. Cell Metab., 2005. **2**(2): p. 85-93.
93. Brand, M., *Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing*. Exp Gerontol. , 2000. **35**(6-7): p. 811-820.
94. Mailloux, R., Harper, ME., *Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production*. Free Radic Biol Med., 2011. **51**(6): p. 1106-1115.
95. Azzu, V., Brand, MD., *The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins*. Trends Biochem Sci., 2010. **35**(5): p. 298-307.
96. Echtay, K., Roussel, D., St-Pierre, J., Jekabsons, MB., Cadenas, S., Stuart, JA., Harper, JA., Roebuck, SJ., Morrison, A., Pickering, S., Clapham, JC., Brand, MD., *Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins*. Nature., 2002. **415**(6867): p. 96-99.
97. Echtay, K., Esteves, TC., Pakay, JL., Jekabsons, MB., Lambert, AJ., Portero-Otín, M., Pamplona, R., Vidal-Puig, AJ., Wang, S., Roebuck, SJ., Brand, MD., *A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling*. EMBO J., 2003. **22**(16): p. 4103-4110.
98. Cannon, B., Shabalina, IG., Kramarova, TV., Petrovic, N., Nedergaard, J., *Uncoupling proteins: a role in protection against reactive oxygen species—or not?* Biochim Biophys Acta., 2006. **1757**(5-6): p. 449-458.
99. Golozoubova, V., Hohtola, E., Matthias, A., Jacobsson, A., Cannon, B., Nedergaard, J., *Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold*. FASEB J., 2001. **15**(11): p. 2048-2050.
100. Teshima, Y., Akao, M., Jones, SP., Marbán, E., *Uncoupling protein-2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes*. Circ Res., 2003. **93**(3): p. 192-200.
101. Lee, S., Robson-Doucette, CA., Wheeler, MB., *Uncoupling protein 2 regulates reactive oxygen species formation in islets and influences susceptibility to diabetogenic action of streptozotocin*. J. Endocrinol., 2009. **203**(1): p. 33-43.
102. Nabben, M., Hoeks, J., Briedé, JJ., Glatz, JF., Moonen-Kornips, E., Hesselink, MK., Schrauwen, P., *The effect of UCP3 overexpression on mitochondrial ROS production in skeletal muscle of young versus aged mice*. FEBS Lett., 2008. **582**(30): p. 4147-4152.
103. Vidal-Puig, A., Grujic, D., Zhang, CY., Hagen, T., Boss, O., Ido, Y., Szczepanik, A., Wade, J., Mootha, V., Cortright, R., Muoio, DM., Lowell, BB., *Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice*. J Biol Chem., 2000. **275**(21): p. 16258-16266.
104. Youle, R., van der Bliek, AM., *Mitochondrial fission, fusion, and stress*. Science., 2012. **337**(6089): p. 1062-1065.
105. Kubli, D., Gustafsson, ÅB., *Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control*. Circ Res., 2012. **111**(9): p. 1208-1221.
106. Narendra, D., Tanaka, A., Suen, DF., Youle, RJ., *Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy*. J Cell Biol., 2008. **183**(5): p. 795-803.
107. Suen, D., Norris, KL., Youle, RJ., *Mitochondrial dynamics and apoptosis*. Genes Dev., 2008. **22**(12): p. 1577-1590.

108. Tanaka, A., Kobayashi, S., Fujiki, Y., *Peroxisome division is impaired in a CHO cell mutant with an inactivating point-mutation in dynamin-like protein 1 gene*. Exp Cell Res., 2006. **312**(9): p. 1671-1684.
109. Pridgeon, J., Olzmann, JA., Chin, LS., Li, L., *PINK1 protects against oxidative stress by phosphorylating mitochondrial chaperone TRAP1*. PLoS Biol., 2007. **5**(7).
110. Hebert, S., Lanza, IR., Nair, KS., *Mitochondrial DNA alterations and reduced mitochondrial function in aging*. Mech Ageing Dev., 2010. **131**(7-8): p. 451-462.
111. Shuster, R., Rubenstein, AJ., Wallace, DC., *Mitochondrial DNA in anucleate human blood cells*. Biochem Biophys Res Commun., 1988. **155**(3): p. 1360-13605.
112. Wallace, D., *Mitochondrial DNA mutations in disease and aging*. Environ Mol Mutagen., 2010. **51**(5): p. 440-450.
113. Cortopassi, G., Arnheim, N., *Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans*. Nucleic Acids Res., 1990. **18**(23): p. 6927-6933.
114. Schwarze, S., Lee, CM., Chung, SS., Roecker, EB., Weindruch, R., Aiken, JM., *High levels of mitochondrial DNA deletions in skeletal muscle of old rhesus monkeys*. Mech Ageing Dev., 1995. **83**(2): p. 91-101.
115. Khaidakov, M., Heflich, RH., Manjanatha, MG., Myers, MB., Aidoo, A., *Accumulation of point mutations in mitochondrial DNA of aging mice*. Mutat Res., 2003. **526**(1-2): p. 1-7.
116. Ballinger, S., Shoffner, JM., Hedaya, EV., Trounce, I., Polak, MA., Koontz, DA., Wallace, DC., *Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion*. Nat Genet., 1992. **1**(1): p. 11-15.
117. Moraes, C., DiMauro, S., Zeviani, M., Lombes, A., Shanske, S., Miranda, AF., Nakase, H., Bonilla, E., Werneck, LC., Servidei, S., et al., *Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome*. N Engl J Med., 1989. **320**(20): p. 1293-1299.
118. Goto, M., Komaki, H., Saito, T., Saito, Y., Nakagawa, E., Sugai, K., Sasaki, M., Nishino, I., Goto, Y., *MELAS phenotype associated with m.3302A>G mutation in mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene*. Brain Dev., 2014. **36**(2): p. 180-182.
119. Holt, I., Harding, AE., Petty, RK., Morgan-Hughes, JA., *A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy*. Am J Hum Genet., 1990. **46**(3): p. 428-433.
120. Wallace, D., Singh, G., Lott, MT., Hodge, JA., Schurr, TG., Lezza, AM., Elsas, LJ 2nd., Nikoskelainen, EK., *Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy*. Science., 1988. **242**(4884): p. 1427-1430.
121. Brecht, M., Richardson, M., Taranath, A., Gris, S., Thorburn, D., Bratkovic, D., *Leigh Syndrome Caused by the MT-ND5 m.13513G>A Mutation: A Case Presenting with WPW-Like Conduction Defect, Cardiomyopathy, Hypertension and Hyponatraemia*. JIMD Rep., 2015.
122. Kennedy, S., Loeb, LA., Herr, AJ., *Somatic mutations in aging, cancer and neurodegeneration*. Mech Ageing Dev., 2012. **133**(4): p. 118-126.
123. Harman, D., *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. J Gerontol., 1956. **11**(3): p. 298-300.
124. Balaban, R., Nemoto, S., Finkel, T., *Mitochondria, oxidants, and aging*. Cell., 2005. **120**(4): p. 483-495.
125. Shigenaga, M., Hagen, TM., Ames, BN., *Oxidative damage and mitochondrial decay in aging*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1994. **91**(23): p. 10771-10778.
126. Hekimi, S., Lapointe, J., Wen, Y., *Taking a "good" look at free radicals in the aging process*. Trends Cell Biol., 2011. **21**(10): p. 569-576.

127. Van Raamsdonk, J., Hekimi, S., *Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in Caenorhabditis elegans*. PLoS Genet., 2009. **5**(2).
128. Van Remmen, H., Ikeno, Y., Hamilton, M., Pahlavani, M., Wolf, N., Thorpe, SR., Alderson, NL., Baynes, JW., Epstein, CJ., Huang, TT., Nelson, J., Strong, R., Richardson, A., *Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging*. Physiol Genomics., 2003. **16**(1): p. 29-37.
129. Berridge, M., Bootman, MD., Lipp, P., *Calcium--a life and death signal*. Nature. , 1998. **395**(6703): p. 645-648.
130. Gellerich, F., Gizatullina, Z., Trumbeckaite, S., Nguyen, HP., Pallas, T., Arandarcikaite, O., Vielhaber, S., Seppet, E., Striggow, F., *The regulation of OXPHOS by extramitochondrial calcium*. Biochim Biophys Acta., 2010. **1797**(6-7): p. 1018-1027.
131. Brookes, P., Yoon, Y., Robotham, JL., Anders, MW., Sheu, SS., *Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle*. Am J Physiol Cell Physiol., 2004. **287**(4): p. 817-833.
132. Berridge, M., *The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle*. Cell Calcium., 2002. **32**(5-6): p. 235-249.
133. Denton, R., McCormack, JG., Edgell, NJ., *Role of calcium ions in the regulation of intramitochondrial metabolism. Effects of Na⁺, Mg²⁺ and ruthenium red on the Ca²⁺-stimulated oxidation of oxoglutarate and on pyruvate dehydrogenase activity in intact rat heart mitochondria*. Biochem J., 1980. **190**(1): p. 107-117.
134. Rutter, G., Denton, RM., *Regulation of NAD⁺-linked isocitrate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase by Ca²⁺ ions within toluene-permeabilized rat heart mitochondria. Interactions with regulation by adenine nucleotides and NADH/NAD⁺ ratios*. Biochem J., 1988. **252**(1): p. 181-189.
135. Denton, R., McCormack, JG., Edgell, NJ., *Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions*. Biochim Biophys Acta., 2009. **1787**(11): p. 1309-1316.
136. Huang, B., Gudi, R., Wu, P., Harris, RA., Hamilton, J., Popov, KM., *Isoenzymes of pyruvate dehydrogenase phosphatase. DNA-derived amino acid sequences, expression, and regulation*. J Biol Chem., 1998. **273**(28): p. 17680-17688.
137. McCormack, J., Denton, RM., *The effects of calcium ions and adenine nucleotides on the activity of pig heart 2-oxoglutarate dehydrogenase complex*. Biochem J., 1979. **180**(3): p. 533-544.
138. Satrústegui, J., Pardo, B., Del Arco, A., *Mitochondrial transporters as novel targets for intracellular calcium signaling*. Physiol Rev., 2007. **87**(1): p. 29-67.
139. Contreras, L., Gomez-Puertas, P., Iijima, M., Kobayashi, K., Saheki, T., Satrústegui, J., *Ca²⁺ Activation kinetics of the two aspartate-glutamate mitochondrial carriers, aralar and citrin: role in the heart malate-aspartate NADH shuttle*. J Biol Chem., 2007. **282**(10): p. 7098-7106.
140. Cavero, S., Traba, J., Del Arco A., Satrústegui, J., *The calcium-dependent ATP-Mg/Pi mitochondrial carrier is a target of glucose-induced calcium signalling in Saccharomyces cerevisiae*. Biochem J., 2005. **392**(3): p. 537-544.
141. MacDonald, M., Brown, LJ., *Calcium activation of mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase restudied*. Arch Biochem Biophys., 1996. **326**(1): p. 79-84.
142. Idahl, L., Lember, N., *Glycerol 3-phosphate-induced ATP production in intact mitochondria from pancreatic B-cells*. Biochem J., 1995. **312**(1): p. 287-292.

143. Rutter, G., Pralong, WF., Wollheim, CB., *Regulation of mitochondrial glycerol-phosphate dehydrogenase by Ca^{2+} within electroporabilized insulin-secreting cells (INS-1)*. Biochim Biophys Acta., 1992. **1175**(1): p. 107-113.
144. Hajnóczky, K., Davies, E., Madesh, M., *Calcium signaling and apoptosis* Biochem Biophys Res Commun., 2003. **304**(3): p. 445-454.
145. Cleeter, M., Cooper, JM., Darley-USmar, VM., Moncada, S., Schapira, AH., *Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases*. FEBS Lett., 1994. **345**(1): p. 50-54.
146. Ott, M., Robertson, JD., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., *Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process*. Proc Natl Acad Sci U S A., 2002. **99**(3): p. 1259-1263.
147. Halestrap, A., Brenner, C., *The Adenine Nucleotide Translocase: A Central Component of the Mitochondrial Permeability Transition Pore and Key Player in Cell Death*. Curr Med Chem., 2003. **10**(16): p. 1507-1025.
148. Boehning, D., Patterson, RL., Snyder, SH., *Apoptosis and calcium: new roles for cytochrome c and inositol 1,4,5-trisphosphate*. Cell Cycle., 2004. **3**(3): p. 252-254.
149. Nicholls, D., Budd, SL., Ward, MW., Castilho, RF., *Excitotoxicity and mitochondria*. Biochem Soc Symp., 1999. **66**: p. 55-67.
150. Stone, D., Darley-USmar, V., Smith, DR., O'Leary, V., *Hypoxia-reoxygenation induced increase in cellular Ca^{2+} in myocytes and perfused hearts: the role of mitochondria*. J Mol Cell Cardiol., 1989. **21**(10): p. 963-973.
151. Ben-Hail, D., Palty, R., Shoshan-Barmatz, V., *Measurement of Mitochondrial Ca^{2+} Transport Mediated by Three Transport Proteins: VDAC1, the Na^{+}/Ca^{2+} Exchanger, and the Ca^{2+} Uniporter*. Cold Spring Harb Protoc., 2014. **2014**(2): p. 161-166.
152. Báthori, G., Csordás, G., Garcia-Perez, C., Davies, E., Hajnóczky, G., *Ca^{2+} -dependent control of the permeability properties of the mitochondrial outer membrane and voltage-dependent anion-selective channel (VDAC)*. J Biol Chem., 2006. **281**(25): p. 17347-17358.
153. Litsky, M., Pfeiffer, DR., *Regulation of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter by external adenine nucleotides: the uniporter behaves like a gated channel which is regulated by nucleotides and divalent cations*. Biochemistry., 1997. **36**(23): p. 7071-7080.
154. Patron, M., Checchetto, V., Raffaello, A., Teardo, E., Vecellio Reane, D., Mantoan, M., Granatiero, V., Szabò, I., De Stefani, D., Rizzuto, R., *MICU1 and MICU2 finely tune the mitochondrial Ca^{2+} uniporter by exerting opposite effects on MCU activity*. Mol Cell., 2014. **53**(5): p. 726-737.
155. Hoffman, N., Chandramoorthy, HC., Shanmughapriya, S., Zhang, XQ., Vallem, S., Doonan, PJ., Malliankaraman, K., Guo, S., Rajan, S., Elrod, JW., Koch, WJ., Cheung, JY., Madesh, M., *SLC25A23 augments mitochondrial Ca^{2+} uptake, interacts with MCU, and induces oxidative stress-mediated cell death*. Mol Biol Cell., 2014. **25**(6): p. 936-947.
156. De Marchi, U., Santo-Domingo, J., Castelbou, C., Sekler, I., Wiederkehr, A., Demaurex, N., *NCLX protein, but not LETM1, mediates mitochondrial Ca^{2+} extrusion, thereby limiting Ca^{2+} -induced NAD(P)H production and modulating matrix redox state*. J Biol Chem., 2014. **289**(29): p. 20377-20385.
157. Zhao, Y., Araki, S., Wu, J., Teramoto, T., Chang, Y., Nakano, M., Abdelfattah, AS., Fujiwara, M., Ishihara, T., Nagai, T., Campbell, RE., *An Expanded Palette of Genetically Encoded Ca^{2+} Indicators*. Science., 2011. **333**(6051): p. 1888-1891.
158. Wu, J., Liu, L., Matsuda, T., Zhao, Y., Rebane, A., Drobizhev, M., Chang, YF., Araki, S., Arai, Y., March, K., Hughes, TE., Sagou, K., Miyata, T., Nagai, T., Li, WH.,

- Campbell, RE., *Improved orange and red Ca²⁺ indicators and photophysical considerations for optogenetic applications*. ACS Chem Neurosci., 2013. **4**(6): p. 963-972.
159. Schmitt, H., Lenzen, S., Baltrusch, S., *Glucokinase mediates coupling of glycolysis to mitochondrial metabolism but not to beta cell damage at high glucose exposure levels*. Diabetologica., 2011. **54**(7): p. 1744-1755.
 160. Fontanesi, F., Soto, I.C., Barrientos, A., *Cytochrome c Oxidase Biogenesis: New levels of Regulation*. IUBMB Life, 2008. **60**(9): p. 557-568.
 161. Arnold, S., *The power of life--cytochrome c oxidase takes center stage in metabolic control, cell signalling and survival*. Mitochondrion. , 2012. **12**(1): p. 46-56.
 162. Massa, V., Fernandez-Vizarra, E., Alshahwan, S., Bakhsh, E., Goffrini, P., Ferrero, I., Mereghetti, P., D'Adamo, P., Gasparini, P., Zeviani, M., *Severe Infantile Encephalomyopathy Caused by a Mutation in COX6B1, a Nucleus-Encoded Subunit of Cytochrome C Oxidase*. Am J Hum Genet., 2008. **82**(6): p. 1281-1289.
 163. Garesse, R., Vallejo, CG., *Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes*. Gene., 2001. **263**(1-2): p. 1-16.
 164. Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, RC., Spiegelman, BM., *Mechanisms Controlling Mitochondrial Biogenesis and Respiration through the Thermogenic Coactivator PGC-1*. Cell., 1999. **98**(1): p. 115-124.
 165. Schagger, H., Pfeiffer, K., *Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria*. EMBO J., 2000. **19**(8): p. 1777-1783.
 166. Genova, M., Lenaz, G., *Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes*. Biochim Biophys Acta., 2014. **1837**(4): p. 427-443.
 167. Chen, Y., Taylor, EB., Dephoure, N., Heo, JM., Tonhato, A., Papandreou, I., Nath, N., Denko, Nc., Gygi, SP., Rutter, J., *Identification of a protein mediating respiratory supercomplex stability*. Cell Metab., 2012. **15**(3): p. 348-360.
 168. Otten, A., Smeets, HJ., *Evolutionary defined role of the mitochondrial DNA in fertility, disease and ageing*. Hum Reprod Update., 2015. **21**(5): p. 671-689.
 169. Shokolenko, I., Wilson, GL., Alexeyev, MF., *The "fast" and the "slow" modes of mitochondrial DNA degradation*. Mitochondrial DNA., 2014. **Epub ahead of print**.
 170. Wang, Y., Lee, WC., Liao, SC., Lee, LC., Su, YJ., Lee, CT., Chen, JB., *Mitochondrial DNA copy number correlates with oxidative stress and predicts mortality in nondiabetic hemodialysis patients*. J Nephrol., 2011. **24**(3): p. 351-358.
 171. Liu, C., Tsai, CS., Kuo, CL., Chen, HW., Lii, CK., Ma, YS., Wei, YH., *Oxidative stress-related alteration of the copy number of mitochondrial DNA in human leukocytes*. Free Radic Res., 2003. **37**(12): p. 1307-1317.
 172. Qiu, C., Hevner, K., Abetew, D., Sedensky, M., Morgan, P., Enquobahrie, DA., Williams, MA., *Mitochondrial DNA copy number and oxidative DNA damage in placental tissues from gestational diabetes and control pregnancies: a pilot study*. Clin Lab., 2013. **59**(5-6): p. 655-660.
 173. Campisi, J., d'Adda di Fagagna, F., *Cellular senescence: when bad things happen to good cells*. Nat Rev Mol Cell Biol., 2007. **8**(9): p. 729-740.
 174. Fausto, N., Campbell, JS., Riehle, KJ., *Liver regeneration*. J Hepatol., 2012. **57**(3): p. 692-994.
 175. Schultz, J., Baltrusch, S., *Adipöse ob/ob Mäuse weisen eine mitochondriale Dysfunktion in Langerhansschen Inseln, Leber und Fettgewebe auf*. Diabetologie und Stoffwechsel, 2011. **6**(1): p. FV71.
 176. Ahmad, T., Aggarwal, K., Pattnaik, B., Mukherjee, S., Sethi, T., Tiwari, BK., Kumar, M., Micheal, A., Mabalirajan, U., Ghosh, B., Sinha Roy, S., Agrawal, A.,

- Computational classification of mitochondrial shapes reflects stress and redox state.* Cell Death Dis., 2013. **4**(1): p. e461.
177. Liu, X., Hajnocy, G., *Altered fusion dynamics underlie morphological changes in mitochondria during hypoxia-reoxygenation stress.* Cell Death Differ., 2011. **18**: p. 1561-1572.
 178. Tamiya, G., Makino, S., Hayashi, M., Abe, A., Numakura, C., Ueki, M., Tanaka, A., Ito, C., Toshimori, K., Ogawa, N., Terashima, T., Maegawa, H., Yanagisawa, D., Tooyama, I., Tada, M., Onodera, O., Hayasaka, K., *A mutation of COX6A1 causes a recessive axonal or mixed form of Charcot-Marie-Tooth disease.* Am J Hum Genet., 2014. **95**(3): p. 294-300.
 179. Han, B., Izumi, H., Yasuniwa, Y., Akiyama, M., Yamaguchi, T., Fujimoto, N., Matsumoto, T., Wu, B., Tanimoto, A., Sasaguri, Y., Kohno, K., *Human mitochondrial transcription factor A functions in both nuclei and mitochondria and regulates cancer cell growth.* Biochem Biophys Res Commun., 2011. **408**(1): p. 45-51.
 180. German Nutrition Society, *New reference values for energy intake.* Ann Nutr Metab., 2015. **66**(2): p. 219-223.
 181. Miao, L., St Clair, DK., *Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease.* Free Radic Biol Med., 2009. **47**(4): p. 344-356.
 182. Li, Y., Huang, TT., Carlson, EJ., Melov, S., Ursell, PC., Olson, JL., Noble, LJ., Yoshimura, MP., Berger, C., Chan, PH., Wallace, DC., Epstein, CJ., *Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase.* Nat Genet., 1995. **11**(4): p. 376-381.
 183. Lebovitz, R., Zhang, H., Vogel, H., Cartwright, J. Jr., Dionne, L., Lu, N., Huang, S., Matzuk, MM., *Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice.* Proc Natl Acad Sci U S A., 1996. **93**(18): p. 9782-9787.
 184. Elchuri, S., Oberley, TD., Qi, W., Eisenstein, RS., Jackson Roberts, L., Van Remmen, H., Epstein, CJ., Huang, TT., *CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life.* Oncogene., 2005. **24**(3): p. 367-380.
 185. Singh, R., Mailloux, RJ., Puiseux-Dao, S., Appanna, VD., *Oxidative stress evokes a metabolic adaptation that favors increased NADPH synthesis and decreased NADH production in Pseudomonas fluorescens.* J Bacteriol., 2007. **189**(18): p. 6665-6675.
 186. Mai, S., Klinkenberg, M., Auburger, G., Bereiter-Hahn, J., Jendrach, M., *Decreased expression of Drp1 and Fis1 mediates mitochondrial elongation in senescent cells and enhances resistance to oxidative stress through PINK1.* J Cell Sci., 2010. **123**(6): p. 917-926.
 187. Legros, F., Lombès, A., Frachon, P., Rojo, M., *Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins.* Mol Biol Cell., 2002. **13**(12): p. 4343-4354.
 188. Cai, Q., Zakaria, HM., Simone, A., Sheng, ZH., *Spatial Parkin Translocation and Degradation of Damaged Mitochondria via Mitophagy in Live Cortical Neurons.* Curr Biol., 2012. **22**: p. 545-552.
 189. Narendra, D., Jin, SM., Tanaka, A., Suen, DF., Gautier, CA., Shen, J., Cookson, MR., Youle, RJ., *PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin.* PLoS Biol., 2010. **8**(1): p. e1000298.
 190. Vives-Bauza, C., Zhou, C., Huang, Y., Cui, M., de Vries, RL., Kim, J., May, J., Tocilescu, MA., Liu, W., Ko, HS., Magrané, J., Moore, DJ., Dawson, VL., Grailhe, R., Dawson, TM., Li, C., Tieu, K., Przedborski, S., *PINK1-dependent recruitment of*

- Parkin to mitochondria in mitophagy*. Proc Natl Acad Sci U S A., 2010. **107**(1): p. 378-383.
191. Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, ES., Leitner, WW., Robert, EG., Catez, F., Smith, CL., Youle, RJ., *The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis*. Dev Cell., 2001. **1**(4): p. 515-525.
 192. Lee, H., Yin, PH., Lu, CY., Chi, CW., Wei, YH., *Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells*. Biochem J., 2000. **348**(2): p. 425-432.
 193. Unterluggauer, H., Hütter, E., Voglauer, R., Grillari, J., Vöth, M., Bereiter-Hahn, J., Jansen-Dürr, P., Jendrach, M., *Identification of cultivation-independent markers of human endothelial cell senescence in vitro*. Biogerontology., 2007. **8**(4): p. 383-397.
 194. Yoon, Y., Yoon, DS., Lim, IK., Yoon, SH., Chung, HY., Rojo, M., Malka, F., Jou, MJ., Martinou, JC., Yoon G., *Formation of elongated giant mitochondria in DFO-induced cellular senescence: involvement of enhanced fusion process through modulation of Fis1*. J Cell Physiol., 2006. **209**(2): p. 468-480.
 195. Sugioka, R., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., *Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis*. J Biol Chem., 2004. **279**(50): p. 52726-52734.
 196. Jahani-Asl, A., Cheung, EC., Neuspiel, M., MacLaurin, JG., Fortin, A., Park, DS., McBride, HM., Slack, RS., *Mitofusin 2 protects cerebellar granule neurons against injury-induced cell death*. J Biol Chem., 2007. **282**(10): p. 7098-7106.
 197. Rowland, A., Voeltz, GK., *Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction*. Nat Rev Mol Cell Biol., 2012. **13**(10): p. 607-625.
 198. Marchi, S., Patergnani, S., Pinton, P., *The endoplasmic reticulum-mitochondria connection: one touch, multiple functions*. Biochim Biophys Acta., 2014. **1837**(4): p. 461-469.
 199. de Brito, O., Scorrano, L., *Corrigendum: Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria*. Nature., 2008. **456**(7222): p. 605-610.
 200. Groppi, S., Belotti, F., Brandão, RL., Martegani, E., Tisi, R., *Glucose-induced calcium influx in budding yeast involves a novel calcium transport system and can activate calcineurin*. Cell Calcium., 2011. **49**(6): p. 376-386.
 201. Ko, J., Gu, W., Lim, I., Bang, H., Ko, EA., Zhou, T., *Ion channel gene expression in lung adenocarcinoma: potential role in prognosis and diagnosis*. PLoS One., 2014. **9**(1): p. e86569.
 202. Ko, J., Ko, EA., Gu, W., Lim, I., Bang, H., Zhou, T., *Expression profiling of ion channel genes predicts clinical outcome in breast cancer*. Mol Cancer., 2013. **12**(1).
 203. Abu-Hamad, S., Sivan, S., Shoshan-Barmatz, V., *The expression level of the voltage-dependent anion channel controls life and death of the cell*. Proc Natl Acad Sci U S A., 2006. **103**(15): p. 5787-5792.
 204. Trenker, M., , Malli. R., Fertschai, I., Levak-Frank, S., Graier, WF., *Uncoupling proteins 2 and 3 are fundamental for mitochondrial Ca²⁺ uniport*. Nat Cell Biol., 2007. **9**(4): p. 445-452.
 205. Waldeck-Weiermair, M., Malli, R., Naghdi, S., Trenker, M., Kahn, MJ., Graier, WF., *The contribution of UCP2 and UCP3 to mitochondrial Ca(2+) uptake is differentially determined by the source of supplied Ca(2+)*. Cell Calcium., 2010. **47**(5): p. 433-440.
 206. Jaiswal, M., Zech, WD., Goos, M., Leutbecher, C., Ferri, A., Zippelius, A., Carri, MT., Nau, R., Keller, BU., *Impairment of mitochondrial calcium handling in a mtSOD1 cell culture model of motoneuron disease*. BMC Neurosci. , 2009. **10**(64).

Danksagung

In dieser Danksagung möchte ich mich besonders bei Frau Prof. Dr. Simone Baltrusch für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas, die Einführung in die spannende Welt der Fluoreszenzmikroskopie und die hervorragende fachliche Betreuung bedanken. Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Markus Tiedge bedanken im Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie arbeiten und forschen zu dürfen und Forschungsergebnisse auf nationalen und internationalen Fachkongressen vorstellen zu können.

Ich bedanke mich sehr bei Herrn Prof. Dr. Hubert Bahl sich bereit erklärt zu haben, die Vertretung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät für diese Arbeit zu übernehmen.

Bei Frau Dr. Cindy Johne bedanke ich mich herzlich für die hervorragende Einweisung in das Thema der RT-PCR und bei Frau Dr. Julia Schultz bedanke ich mich besonders für die Einführung in das Thema der Fluoreszenzmikroskopie. Bei diesen und bei Herrn Dr. Thomas Schöppe möchte ich mich auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit und für ihr jederzeit offenes Ohr bezüglich wissenschaftlicher Fragen bedanken. Bei Frau Franziska Koch möchte ich mich für die MitoSox Behandlung und die Entnahme von Organen der entsprechenden Mäuse bedanken.

Besonderer Dank gilt außerdem Frau Rica Waterstradt für die Einführung in die Zellkultur, die Methode der Transfektion von Hepatozyten und die Hilfe bei vielen anderen methodischen Fragen. Für die Isolation der Hepatozyten, was der Grundstein dieser Arbeit war, möchte ich mich bei Frau Annett Kott bedanken. Es war beeindruckend ihr bei der Operation an Mäusen zur Hepatozytenisolation zuzusehen. Außerdem möchte ich mich bei Frau Siegrid Giers für die Aufbereitung der Hepatozyten, der Anfertigung von Gewebeschnitte und der Einweisung am Kryostaten bedanken.

Ich bedanke mich auch bei Frau Kerschies für ihre organisatorische Hilfe keine Fristen und Details bei Anträgen zu vergessen.

Bei Susanne, Linda, Lisa, Elke, Claudia, Frau Dr. Anja Siepert, Frau Dr. Heike Weiss, Frau Dr. Mandy Wietzke, Herrn Dr. Tom Büchse und Herrn Dr. Thomas Bittorf bedanke ich mich

für die schöne, freundschaftliche und kollegiale Atmosphäre im Institut und für konstruktive Kritik an meiner Arbeit,

Mein persönlicher Dank gilt meiner ganzen Familie, die mich während meines Biologiestudiums in Mainz und der anschließenden Promotion in Rostock immer unterstützt und ermutigt hat. Außerdem möchte ich mich natürlich auch bei meiner Freundin Tanja bedanken, die mir immer unterstützend zur Seite steht.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Rostock, den 21.12.2016

Jan Niemann